



NIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecnología de Alimentos
(CIDCA-UNLP-CONICET)

**EFFECTO DE DISTINTOS HIDROCOLOIDES SOBRE
LA MICROESTRUCTURA DE LA MASA Y SU
RELACIÓN CON LA CALIDAD DE PRODUCTOS DE
PANIFICACIÓN**

Tesis Doctoral
Linlaud Natalia Elina

Directora
Dra. Cristina Ferrero

Codirectora
Dra. María Cecilia Puppo

Año 2014

El presente trabajo de tesis **“EFECTO DE DISTINTOS HIDROCOLOIDES SOBRE LA MICROESTRUCTURA DE LA MASA Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN”** para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, área Ciencias Biológica de la Universidad Nacional de la Plata fue realizado en El Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET) bajo la dirección de la Dra. Cristina Ferrero y la Codirección de la Dra. María Cecilia Puppo.

Los resultados obtenidos en la tesis fueron publicados en revistas científicas internacionales, nacionales y actas de congresos

En actas de Congresos

“Influence of hydrocolloid on water absorption of wheat flour and dough rheology”

N.E. Linlaud, M.C. Puppo, C. Ferrero

Actas del 13th ICC Cereal and Bread Congress. Cereals in the 21st century: present and future. (ISBN 978-84-612-4517-8). Pág. 345

Madrid, España (2008).

“Absorción de agua en harinas aditivadas con distintos hidrocoloides” N.E. Linlaud,

M.C. Puppo, C. Ferrero

Actas del XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos CYTAL (ISBN 978-987-22165-2-8). Pág. 79. Buenos Aires, Argentina (2007).

“Hydrocolloids as Baking additives: Influence on water absorption and rheology of wheat doughs”. N.E. Linlaud, M.C. Puppo, C. Ferrero

Actas de Internacional Conference on Cereals and Cereals Products Quality and Safety ICC. Rosario, Argentina (2007).

“Efecto de emulsificantes sobre la calidad de masa panaria de harinas de trigos comerciales” N.E. Linlaud, A.V. Gómez, M.C. Puppo, C. Ferrero.

Actas del XXVI congreso Argentino de Química ‘Dr. Angel del carmen Devia’

Editado por Universidad Nacional de San Luis (ISBN: 978-987-1031-45-0), trabajo 9-020, CD-ROM, San Luis, Argentina (2006).

“Emulsificantes: efecto en la panificación con harinas de trigo de diferente calidad”

N.E. Linlaud, A.V. Gómez, M.C. Puppo, C. Ferrero

Actas del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ISBN 987-22457-9-7). Pág. 143. Córdoba, Argentina (2006).

En publicaciones periódicas

“Hydrocolloid interaction with water, protein and starch in wheat dough” N. Linlaud; M.C. Puppo y C. Ferrero.


Journal of Agricultural and Food Chemistry vol 59, cap 2, pag 713-719 (2011).

“Effect of hydrocolloids on water absorption of wheat flour and farinograph and textural characteristics of dough”. N. Linlaud, M. C. Puppo, C. Ferrero

Cereal Chemistry, USA vol 86, cap 4, pag 376-382 (2009).

“Absorción de agua en harinas aditivadas con distintos hidrocoloides”. N. Linlaud, M.C. Puppo, C. Ferrero.

Ingeniería Alimentaria. Editorial Edigar. Buenos Aires (Argentina) pag. 82-90 (2007).



*Dedico esta tesis a todos los que
creyeron y confiaron en mí.*

Resumen

Dentro de los aditivos alimentarios utilizados en productos panificados se encuentran los hidrocoloides. Estos son macromoléculas hidrofílicas capaces de modificar la absorción de agua de la harina, generar cambios en el comportamiento reológico de las masas y en los atributos de calidad del pan. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto y mecanismo de acción de distintos hidrocoloides como aditivos mejoradores en panificación. Se utilizó harina de trigo comercial tipo 000 (proteína total 13,1%, gluten 9,7%, cenizas 0,705%, humedad 14,89%). Los hidrocoloides comerciales empleados fueron: goma guar (GG), xántica (GX), pectina de alto metoxilo (PE), garrofin (LBG) y mezcla de garrofin y xántica (50:50) (LBG+GX) en concentración de 0,25% a 1,5 % en base a harina.

Se analizó la influencia del agregado de distintos hidrocoloides en la absorción de agua de la harina a través de diferentes metodologías: farinograma, capacidad de absorción de agua (WIC), índice de sedimentación (IS SDS) y capacidad de retención de una solución de sacarosa (SRC). En todos los ensayos se observó que los hidrocoloides tendieron a aumentar la absorción de agua farinográfica de las mezclas respecto a la de la harina control y se observó que el efecto era dependiente del tipo y concentración de la goma agregada, obteniéndose los valores más altos con GX y la mezcla LBG+GX en su mayor concentración.

Se evaluaron además las características microestructurales y reológicas de masas obtenidas bajo dos condiciones de hidratación, con agua ajustada según farinograma y con agua constante (igual al valor farinográfico del control sin hidrocoloide).

Se estudió la interacción de los hidrocoloides con los macrocomponentes de la masa (agua, almidón y proteína) a través de diferentes técnicas: microscopía electrónica de barrido (SEM), ensayos de relajación T2 (^1H spin-spin NMR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), ensayos de transformada de Fourier (FT)-Raman y electroforesis (SDS-PAGE). Se observó una alta movilidad en las matrices con goma xántica mientras que la pectina condujo a una movilidad molecular más baja. El agua congelable, determinada por DSC, mostró una

tendencia a incrementar en presencia de hidrocoloide, particularmente bajo condiciones de restricción de agua. En presencia de suficiente agua, la temperatura final de gelatinización del almidón fue decreciendo cuando se agregaron los hidrocoloides. A través de los ensayos de FT-Raman y SDS-PAGE se pudo estudiar el efecto de los hidrocoloides sobre la matriz proteica, observándose que la adición de los mismos condujo a una red más desordenada y débil, principalmente en el caso de la pectina. Por otro lado, los resultados obtenidos en masas con goma guar indicaron una buena compatibilidad entre esta goma y la red de gluten. Se analizaron los extractos de gliadinas y gluteninas a través de SDS-PAGE donde se observó una mayor labilidad de las subunidades proteicas en el caso de GG, PE y LBG.

La reología de la masa se analizó a través de los parámetros farinográficos (tiempo de desarrollo, estabilidad, decaimiento) y perfil de textura (TPA). En el análisis farinografico se observó, en general, que el tiempo de desarrollo aumentó con el agregado de hidrocoloide, se obtuvieron masas más estables con GG y menos estables con PE. En el análisis de perfil de textura se observó que bajo la condición de agua restringida las masas con GX y GG en las concentraciones más altas aumentaron la dureza y con GX y LBG+GX aumentaron la elasticidad; también se observó una disminución de la adhesividad en los casos de PE y LBG. En las masas preparadas con agua adaptada la dureza y adhesividad de la masa disminuyeron en todos los casos excepto con GG, mientras que la elasticidad aumentó para GG y GX.

Para el análisis de calidad de los panes, se determinó el color de la corteza utilizando un colorímetro triestímulo, el volumen específico de las piezas, y se estudió el alveolado de la miga a través del análisis de imágenes. Se analizo también el estudio de perfil de textura de la miga (TPA) y se realizaron ensayos de almacenamiento, humedad y retrogradación del almidón por DSC.

Se observó un aumento en el color de la corteza con el agregado de GX y LBG+GX y una disminución con PE y LBG. El volumen específico aumentó en los panes preparados con GG, PE y LBG. Por otro lado, la dureza y masticabilidad de la miga disminuyeron con el agregado de PE, LBG y LBG+GX, mientras que la

humedad no varió excepto en las migas con PE, en donde fue menor. El alveolado de la miga mostro que para un nivel de goma de 1,5%, en el control, GG y LBG+GX se aprecia una miga más compacta, con alvéolos pequeños mientras que PE, GX y LBG forman migas más abiertas.

Durante el almacenamiento en general se observó una mayor retención de humedad en los panes con hidrocoloide. La dureza, masticabilidad y cohesividad de la miga aumentaron con el tiempo de almacenamiento pero hubo efecto significativo de los hidrocoloides, resultando GX y PE los mejores aditivos para reducir la retrogradación del almidón.

Agradecimientos

Quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a mi directora Dra. Cristina Ferrero por su confianza y apoyo incondicional en la realización de este trabajo. A mi codirectora Dra. Maria Cecilia Puppo por su colaboración principalmente en la escritura y presentación de trabajos.

A la Dra. Cristina Añon por su colaboración y generosa predisposición en la interpretación de datos en las diferentes etapas de este trabajo.

A la Dra. Evelina G. Ferrer por la realización, e interpretación de los resultados de los ensayos de espectroscopía RAMAN.

A la Universidad Nacional de La Plata y al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por haberme abierto sus puertas dándome la posibilidad de realizar mis estudios de postgrado.

A las instituciones y entidades que mediante posibilitaron la realización del presente trabajo. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Al Molino Campodónico Ltd. por la donación de la harina de trigo.

A todos mis compañeros del laboratorio de vegetales por permitirme trabajar allí y compartir muchos buenos momentos.

A las Dras. Laura Lemoine, Paula Conforti, Analía Gomez, Analía Concellon, Victoria Santos, con las que he compartido más que bueno momentos, por haberme acompañado en situaciones difíciles y haberme brindado su apoyo.

A mis compañeros del grupo Trigo y compañeros del CIDCA, muchas gracias

porque de diferentes maneras han colaborado en la realización de este trabajo.

A mi esposo, hijos y mi familia por su amor y acompañamiento incondicional.

Índice

Capítulo 1.....	1	
Introducción General.....	1	
1	Trigo: del cultivo a la molienda.....	2
1.1	Importancia de la producción de trigo a nivel mundial.....	2
1.2	El trigo en la Argentina.....	3
1.3	Estructura y composición del grano de trigo	6
1.4	Factores ambientales que inciden en la composición del grano	9
1.5	Obtención de harina de trigo	10
2	Componentes de la harina de trigo.....	13
2.1	Almidón.....	13
2.2	Proteínas.....	17
2.2.1	Gliadinas	18
2.2.2	Gluteninas	20
2.2.3	Red de gluten y su relación con la aptitud panadera.....	23
2.3	Lípidos	25
2.4	Fibra.....	26
3	Panificación	27
3.1	Cambios microestructurales durante el proceso de panificación.....	27
3.2	Mejoramiento de la calidad de la masa panaria: empleo de aditivos ...	32
4	Hidrocoloides.....	33
4.1	Clasificación y aplicaciones.....	33
4.2	Goma xántica.....	35
4.3	Goma Guar.....	39
4.4	Goma Garrofin.....	41
4.5	Pectina.....	43
Hipótesis.....		47
Objetivo General.....		47
Objetivos específicos.....		47
Desarrollo de la tesis.....		48
Capítulo 2		49
Efecto de los hidrocoloides sobre la capacidad de absorción de agua y la reología de la masa panaria.....		49
2.1	Introducción.....	50
2.1.1	Capacidad de absorción de agua.....	50
2.1.2	Propiedades reológicas.....	51
2.1.3	Microestructura por microscopia.....	53
2.2	Materiales.....	55
2.2.1	Harina.....	55
2.2.2	Hidrocoloides.....	56
2.2.3	Mezcla harina-hidrocoloide.....	56
2.3	Metodologías.....	57
2.3.1	Viscosidad aparente de sistemas hidrocoloide-agua.....	57
2.3.2	Absorción de agua.....	57

2.3.2.1	Absorción de agua farinográfica (A).....	57
2.3.2.2	Capacidad de absorción de agua (WIC).....	58
2.3.2.3	Índice de sedimentación en dodecil sulfato de sodio (IS-SDS).....	59
2.3.2.4	Capacidad de retención de solvente sacarosa (SRC sacarosa).....	60
2.3.3	Ensayos reológicos sobre masa.....	61
2.3.3.1	Parámetros farinográficos.....	61
2.3.3.2	Ensayos alveográficos.....	62
2.3.3.3	Análisis de Perfil de Textura (TPA).....	63
2.3.4	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	65
2.3.5	Análisis estadístico.....	66
2.4	Resultados.....	70
2.4.1	Medición de viscosidad aparente.....	70
2.4.2	Absorción de agua.....	70
2.4.3	Análisis reológico de la masa.....	77
2.4.4	Microscopia de la masa.....	92
2.5	Conclusiones parciales.....	95
Capítulo 3		96
Interacción de los hidrocoloides con los principales componentes de la masa		96
3.1	Introducción.....	97
3.1.1	Movilidad molecular a través de ensayos de relajación T ₂ (¹ H-RMN)	97
3.1.2	Transiciones térmicas del sistema por calorimetría diferencial de barrido.....	99
3.1.3	Estructura de las proteínas de gluten.....	101
3.1.3.1	Espectroscopia FT-Raman.....	101
3.1.3.2	Electroforesis.....	104
3.2	Materiales.....	106
3.2.1	Preparación de la masa.....	106
3.3	Metodologías.....	107
3.3.1	NMR: ensayos de relajación T ₂	107
3.3.2	Ensayos de calorimetría diferencial de barrido.....	108
3.3.2.1	Determinación de agua congelable y temperaturas de transición vítrea.....	108
3.3.2.2	Gelatinización del almidón.....	109
3.3.2.3	Interacción proteínas de gluten-hidrocoloide.....	110
3.3.2.3.1	Análisis por calorimetría diferencial de barrido.....	110
3.3.3	Espectroscopía FT- Raman	111
3.3.3.1	Obtención del gluten.....	111
3.3.3.2	Obtención de los espectros.....	111
3.3.4	Perfiles electroforéticos de los extractos proteicos obtenidos de masas con hidrocoloide.....	112
3.3.4.1	Extracción de las diferentes fracciones proteicas.....	112
3.3.4.1.1	Método estandarizado para harinas.....	113

3.3.4.1.2	Método secuencial de Osborne.....	114
3.3.4.2	Separación e Identificación de las subunidades de proteínas por SDS-PAGE.....	114
3.3.5	Análisis estadístico.....	115
3.4	Resultados.....	115
3.4.1	Efecto de los hidrocoloides en la movilidad molecular. Ensayos de relajación ¹ H-RMN.....	115
3.4.2	Agua congelable.....	120
3.4.3	Efecto de los hidrocoloides en la gelatinización del almidón.....	122
3.4.3.1	Efecto de la restricción de agua.....	125
3.4.3	Efecto de los hidrocoloides en la estructura de las proteínas.....	128
3.4.3.1	Sistema glutenina-hidrocoloide: propiedades térmicas.....	128
3.4.3.2	Cambios de estructura secundaria de proteínas de gluten.....	132
3.4.3.2.1	Banda Amida I.....	132
3.4.3.2.2	Análisis de vibración de las cadenas secundarias.....	136
3.4.3.3	Composición de las fracciones de gliadinas y gluteninas.....	139
3.5	Conclusiones parciales.....	143
Capítulo 4.....		144
Efecto de los hidrocoloides sobre el proceso de panificación y atributos de calidad de los panes.....		144
4	Introducción.....	145
4.1	Materiales.....	147
4.2	Metodología.....	147
4.2.1	Proceso de panificación.....	147
4.2.1.1	Formulación de la masa.....	147
4.2.1.2	Determinación del tiempo óptimo de fermentación.....	148
4.2.1.3	Obtención de los panes.....	148
4.2.3	Evaluación de la calidad de los panes.....	150
4.2.3.1	Color de la corteza.....	150
4.2.3.2	Volumen específico.....	152
4.2.3.3	Alveolado de miga por análisis de imágenes.....	152
4.2.3.4	Análisis de Perfil de Textura de la miga.....	154
4.2.4	Ensayos de almacenamiento.....	154
4.2.4.1	Humedad de la miga.....	154
4.2.4.2	Análisis de perfil de textura.....	154
4.2.4.3	Retrogradación del almidón por calorimetría diferencial de barrido.....	155
4.3	Análisis estadístico.....	156
4.4	Resultados.....	156
4.4.1	Tiempos de fermentación.....	156
4.4.2	Efecto de los hidrocoloides sobre el color de la corteza.....	160
4.4.3	Volumen específico.....	162
4.4.4	Análisis de perfil de textura de la miga.....	164

4.4.5	Humedad de la miga.....	168
4.4.6	Análisis del alveolado.....	168
4.4.7	Correlación de resultados.....	172
4.4.8	Almacenamiento de los panes.....	174
4.4.8.1	Humedad de la miga.....	174
4.4.8.2	Textura de la miga.....	175
4.4.8.3	Retrogradación de amilopectina.....	182
4.5	Conclusiones parciales.....	185
Capítulo 5.....		186
Conclusiones Generales.....		186
Bibliografía.....		191
Glosario.....		208

Capítulo 1

Introducción General

1Trigo: del cultivo a la molienda

1.1 Importancia de la producción de trigo a nivel mundial

Con el nombre de trigo se designa a los cereales pertenecientes al género *Triticum*. La palabra latina que designa al género significa “quebrado”, “trillado” o “triturado” y hace referencia a la operación que permite separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre.

El trigo es utilizado como fuente de alimentación básica desde la edad de piedra (6700 A.C.) y ha sido cultivado aproximadamente desde 5000 años A.C. El origen geográfico del trigo se sitúa al norte de Palestina y en Asia menor. De allí su cultivo se extendió a las civilizaciones del antiguo Egipto, Grecia y Roma, alcanzando luego al resto de Europa y Extremo Oriente (China). En el siglo XVI los españoles lo introdujeron en América (Gómez Pallares y col. 2007). Hoy el trigo ocupa el tercer lugar entre los cereales cultivados a nivel mundial, detrás del maíz –base de la dieta del continente americano- y del arroz, principal cereal en el continente asiático. Estos tres cereales han acompañado el desarrollo de las grandes civilizaciones, ya que su cultivo y acopio permitió garantizar una alimentación constante.

Las especies de trigo moderno más difundidas, trigo común o pan (*Triticum aestivum*) y trigo duro o fideo (*Triticum durum*) han evolucionado a partir del entrecruzamiento de tres variedades de granos ancestrales y por cruzamientos con trigos silvestres y son relativamente nuevas en comparación con las originales. Las tres especies originales –conocidas como granos antiguos- son Espelta (*T. spelta*), Farro (*T. diococcum*) y Escanda (*T. monococcum*) (Collar, 2007).

En la actualidad el cultivo de trigo está geográficamente muy extendido y en los últimos años ha registrado incrementos importantes, obteniéndose un récord mundial de producción en el año 2008. En la Figura 1.1 se observan los datos comparativos (en millones de toneladas) para los principales países productores durante esa campaña.

De acuerdo al informe del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) la producción mundial de trigo en el periodo 2007/2008 fue de 603,0 millones de toneladas. Actualmente los principales productores son Unión Europea, China, India y Estados Unidos, quedando nuestro país en la posición 16 dentro de los países productores en el listado de producción (FAO, 2010).

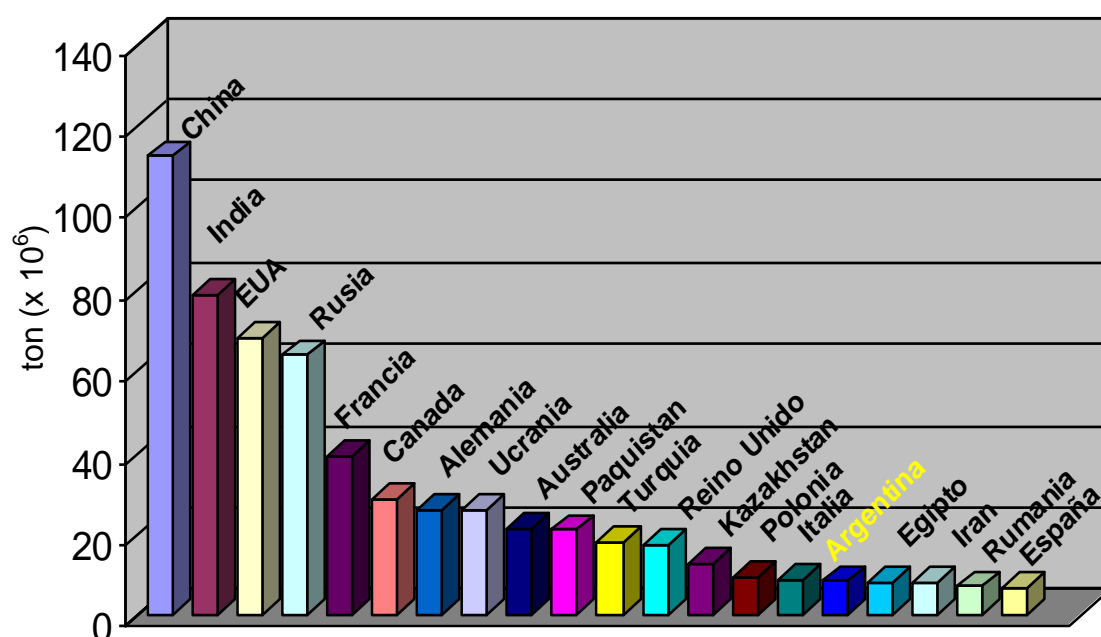


Figura 1.1 Datos comparativos en millones de toneladas de los principales países productores de trigo, 2008. Fuente: FAO (2010)

1.2 El trigo en la Argentina

En nuestro país, la historia de este cultivo se remonta a la llegada de los colonizadores españoles; las primeras semillas fueron sembradas en el primer establecimiento español, conocido con el nombre de Sancti Spiritu, fundado por Sebastián Gaboto en junio de 1527, en la confluencia de los ríos Carcarañá y Coronda, dentro del actual departamento de San Jerónimo

de la Provincia de Santa Fe. El primer molino harinero se estableció en Córdoba en el año 1580.

A pesar de sus antiguos inicios, la expansión del cultivo de trigo en la Argentina comienza a partir de 1850 produciendo una transformación en el agro argentino al originar la agricultura extensiva. En 1878, las exportaciones de trigo superan por primera vez a las importaciones y a partir de 1899 Argentina se transforma en un exportador neto. Tres factores explican este crecimiento: las campañas sucesivas con condiciones climáticas muy favorables para el desarrollo de los cultivos, los altos precios recibidos por los productores al comenzar una etapa de sustitución de importaciones y un importante aumento en el consumo interno, ya que un aumento en la cantidad de inmigrantes impuso en el resto de la población el gusto europeo por el consumo de pan.

A fin del siglo XIX el cultivo se expande hacia el sur, llegando a Buenos Aires, provincia en donde la superficie sembrada con este cereal comienza a aumentar rápidamente. De 320.000 hectáreas en 1891, el área sembrada aumentó a 400.000 hectáreas en 1895 y a 800.000 en 1900. Al año siguiente, la cosecha en Buenos Aires superó por primera vez a la de Santa Fe. La rápida expansión de las líneas férreas brindó sostén a esta tendencia y el trigo comenzó a extenderse en centenares de campos a lo largo del Ferrocarril Sur a Bahía Blanca (Origen del trigo).

Se puede decir entonces, que la introducción de este cultivo en lo que actualmente es el territorio de la Argentina data de la época de la llegada de los primeros colonizadores y su evolución ha acompañado a la historia de la Nación a través de diferentes transformaciones económicas y sociales.

Nuestro país es uno de los principales productores de trigo; en el 2008 el trigo ocupó el quinto lugar en la producción agropecuaria como se observa en la Figura 1.2 (FAO, 2010). Anualmente se industrializan entre 4,7 y 5,2 millones de toneladas de granos. De ellos, se obtienen aproximadamente 3,8 millones de toneladas de harina, de las cuales el 73% se destina a la elaboración de pan. El consumo por habitante en el año 2006 alcanzó los

72,5 Kg por año de pan tradicional y 4,0 Kg por año de pan industrial. El primero es distribuido en su totalidad en los comercios tradicionales y el industrial se expende principalmente en supermercados y autoservicios (www.alimentosargentinos.gov.ar).

El pan es, por lo tanto, uno de los productos alimenticios más importantes de consumo en todos los hogares, debido a su gran aceptación y relativo bajo costo en comparación con otros alimentos.

La calidad del pan dependerá en gran medida de la calidad de la harina de trigo empleada. A su vez, las características de la harina, producto obtenido de la molienda del fruto (grano) de este cereal dependerán tanto de la variedad de trigo de partida como de las condiciones ambientales del cultivo y finalmente del proceso de molienda en sí.

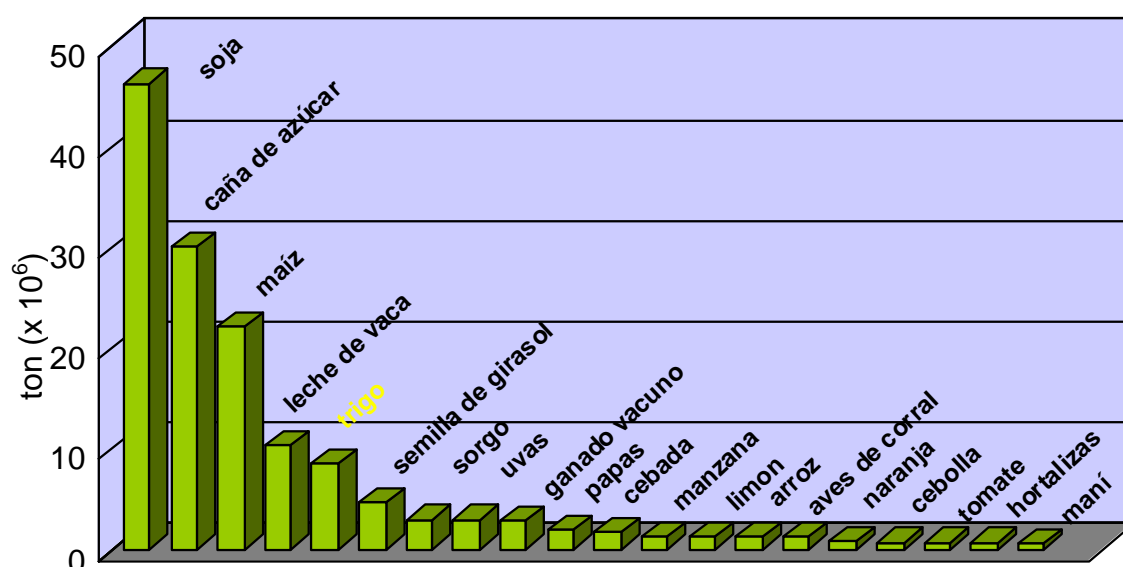


Figura 1.2 Datos comparativos en millones de toneladas de los principales productos agropecuarios argentinos (2008) según datos de la FAO. Fuente: FAO (2010)

A continuación se describirán algunos aspectos concernientes a la estructura del grano y a los factores mencionados.

1.3 Estructura y composición del grano de trigo

El trigo es una planta anual de la familia de las gramíneas, que pertenece al género *Triticum*. Las gramíneas o poáceas (Poaceae Barnhart) son una familia de plantas herbáceas, monocotiledóneas. Tienen tallos cilíndricos a elípticos en su sección transversal, llamados cañas, en general con nudos macizos y entrenudos huecos. Los nudos son algo más gruesos que los entrenudos y en ellos nacen las hojas y las yemas. La inflorescencia de las gramíneas es una pequeña espiga, formada por un tallo central de entrenudos cortos, donde se encuentran sentadas una o más flores, protegidas por brácteas estériles denominadas glumas. Dentro de cada espiga los estambres polinizan los pistilos generando numerosos granos. El grano (Figura 1.3) es el fruto, denominado cariópside, de esta planta.

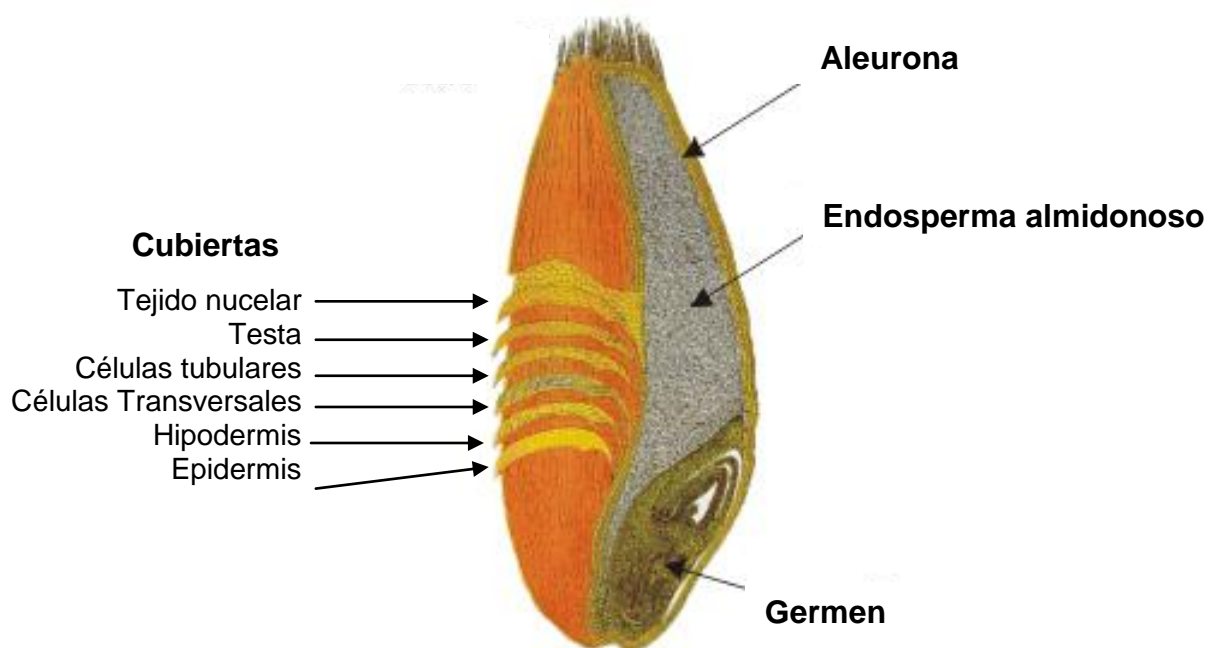


Figura 1.3 Morfología del grano de trigo. Adaptada de Fennema, (1993) y

www.canimolt.org/trigo/estructura-del-grano

Es uniseminado, indehisciente y seco. Una de las características de este tipo de frutos es que el pericarpio o envoltura del mismo, formado por varias capas, está firmemente adherido a la semilla. Las principales funciones del pericarpio son proteger el grano contra agentes bióticos externos (insectos, microorganismos), impedir la pérdida de humedad y conducir y distribuir el agua y otros nutrientes durante germinación.

Junto con los tegumentos seminales y la primera capa celular del endosperma constituye la parte externa del grano o salvado. El pericarpio y los tegumentos seminales se denominan en conjunto “cubiertas” y constituyen alrededor del 10,5 % del grano. Desde afuera hacia adentro están compuestas por el epicarpio o epidermis (“alas de abeja”), mesocarpio o hipodermis, endocarpio (compuesto por dos capas: células transversales y células tubulares) y dos capas de tegumentos (testa y capa hialina o nucelar) (Fennema, 1993).

Se distinguen además, siendo parte de la semilla, el germen o embrión y el endosperma almidonoso que es la parte más interna, de donde se obtiene la harina (Gómez Pallares y col. 2007).

Desde el punto de vista químico, las cubiertas están constituidas por celulosa, hemicelulosa, lignina (fibra dietaria), son ricas en vitamina B1, minerales (como calcio, hierro) y contienen un alto porcentaje de proteínas (fundamentalmente albúminas y globulinas).

A su vez el endosperma presenta dos zonas: la capa de células diferenciadas denominada aleurona y el endosperma almidonoso (Fennema 1993) (Figura 1.4). La aleurona representa el 4,5 % del total del grano y es una capa muy fina, de células cúbicas, que se encuentra inmediatamente debajo del tejido nucelar. Es rica en minerales y vitaminas. Durante la molienda esta capa se separa conjuntamente con las cubiertas constituyendo el salvado, que se utiliza como ingrediente alimentario.

El endosperma almidonoso (82 % del fruto) está constituido por células de paredes delgadas cuyo tamaño, forma y composición varía desde la periferia hacia el centro del grano. Las células más periféricas son cúbicas y menos

ricas en almidón; las más centrales del endosperma son poliédricas y más ricas en almidón. La cantidad de proteína varía en forma inversa: disminuye desde la periferia hacia el interior del endosperma.

El almidón se encuentra organizado en forma de gránulos y rodeado por una matriz proteica; el 100 % del almidón del fruto está localizado en el endosperma. Las proteínas del endosperma son de reserva: gliadinas (prolaminas del trigo) y gluteninas (glutelinas del trigo) y constituyen aproximadamente el 85 % de las proteínas totales del grano.

Finalmente, el germen o embrión es la parte del grano que dará origen a la nueva planta. Representa el 3 % del total del fruto. Es rico en proteínas, lípidos, en particular ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico), vitaminas E y B1 y minerales como Fe, Zn, K. Durante la molienda se separa y es derivado a otros fines industriales.

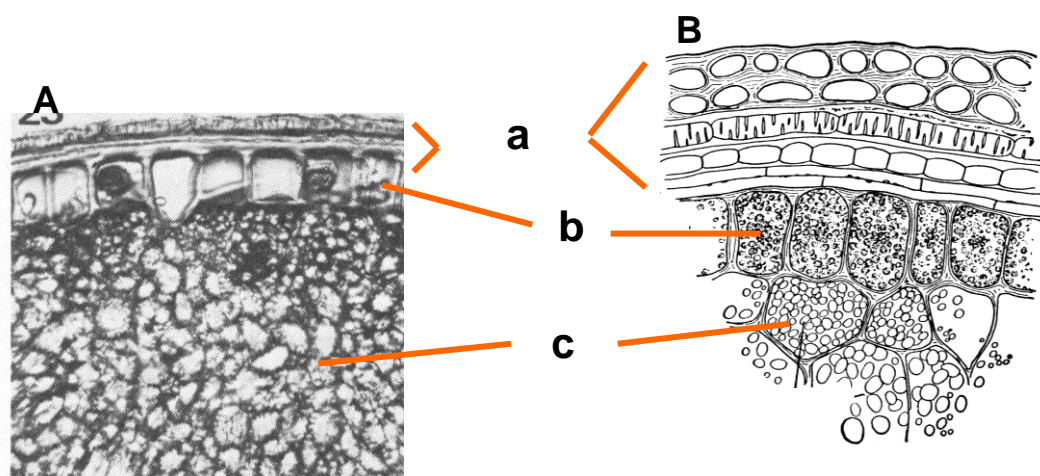


Figura 1.4 Corte transversal del grano de trigo a) tegumentos del ovario del grano que forman el salvado; b) células de la capa de aleurona del endosperma ricas en proteína; c) células que contienen almidón del endosperma almidonoso. Adaptado de A) Fennema 1993 y B) Coulter y col., 1910.

Según el artículo 657 del Código Alimentario Argentino el grano de trigo puede clasificarse en dos tipos:

a) *Triticum vulgare* o trigo pan: grano de forma elíptica más o menos redondeado; de color rojizo-amarillento, grisáceo y combinaciones de estos colores; de aspecto opaco; fractura almidonosa, no quebradizo; de gluten húmedo elástico y extensible; con buen o muy buen valor panadero; con un peso de 30-40 g los 1.000 granos.

b) *Triticum durum* (Candeal y Taganrock) o trigo fideo: grano de forma elíptica sensiblemente alargado; de color ámbar claro; aspecto traslúcido, fractura vítrea y gran friabilidad; con gluten húmedo, corto y duro; no apto para panificación con un peso de 50-60 g los 1.000 granos.

Las variedades de *T. durum* se derivan a la industria de pastas mientras que las de *T. vulgare* lo son a la industria de panificados.

1.4 Factores ambientales que inciden en la composición del grano

El trigo crece en nuestro país en la zona comprendida entre 25 y 40° de Latitud y entre 45 y 66° de Longitud. Esta zona se caracteriza por sus inviernos suaves. Para este cultivo, la temperatura no debe ser demasiado fría en invierno ni demasiado elevada en primavera ni durante la maduración, siendo lo óptimo entre 10 y 24°C; temperaturas mayores llevan a altas tasas de crecimiento pero con poco período de relleno del fruto, obteniéndose un grano pequeño y liviano. Los requerimientos de lluvia anual son de 229-762 mm. Se ha demostrado en años secos que un trigo puede desarrollarse bien con 300 ó 400 mm de lluvia, siempre que la distribución de esta lluvia sea escasa en invierno y abundante en primavera. El trigo requiere suelos profundos, para el buen desarrollo del sistema radicular. En general se recomienda que las tierras de secano dispongan de un buen drenaje y en cuanto al pH, se requieren suelos neutros o alcalinos (Infoagro 2010).

De acuerdo a su estación de siembra, el trigo se puede clasificar en trigo de invierno, que se siembra en otoño y crece lentamente hasta la primavera y trigo de primavera, que se siembra en la primavera temprana y se cosecha antes de los primeros fríos en otoño. El primero es característico de lugares donde no hay excesivo enfriamiento del suelo y el segundo de países que experimentan inviernos muy severos (Rusia, Canadá). En la Argentina, el periodo de cosecha habitual es de noviembre a enero (Kent, 1983).

En el período crítico de crecimiento se necesitan temperatura, humedad adecuada, luz y nitrógeno. Durante los primeros 20 días posteriores a la antesis o floración (post antesis, p.a.) se desarrollan las estructuras del grano, llegándose a 100000 células endospermáticas. El peso del almidón del endosperma aumenta rápidamente y casi linealmente desde los 12 días p.a. hasta alcanzar un porcentaje máximo del peso seco del endosperma, alrededor de 35 días p.a. (punto de madurez fisiológica). El volumen del grano se incrementa hasta los 35 días y luego que comienza la maduración, se produce deshidratación con pérdida de volumen, hasta llegar a la madurez completa (50 días). El comienzo de la síntesis de almidón está acompañado por una marcada reducción de la concentración de sacarosa y azúcares reductores. El tiempo durante el cual la síntesis de almidón tiene lugar es de gran importancia, siendo las condiciones estacionales, como la temperatura, precipitaciones y exposición solar factores que controlan la velocidad y duración de la síntesis y por ello el rendimiento global.

El contenido de proteína del grano maduro, uno de los factores de calidad más importantes, está influido por factores ambientales y genéticos. Aunque las influencias ambientales durante el relleno del grano juegan un rol primario, el genotipo y la interacción genotipo/ambiente inciden también fuertemente (Simmonds y O'Brien, 1981).

1.5 Obtención de harina de trigo

Según el Código Alimentario Argentino Cap. IX, art. 661:

“Con la denominación de Harina, sin otro calificativo, se entiende el producto obtenido de la molienda del endosperma del grano de trigo que responda a las exigencias de éste”. Las harinas tipificadas comercialmente con los calificativos: cuatro ceros (0000), tres ceros (000), dos ceros (00), cero (0), medio cero (medio 0), corresponderán a los productos que se obtienen de la molienda gradual y metódica del endosperma en cantidad de 70-80% del grano limpio.”

Si bien el proceso de obtención es complejo, se puede resumir en los pasos que se detallan en la Figura 1.5.

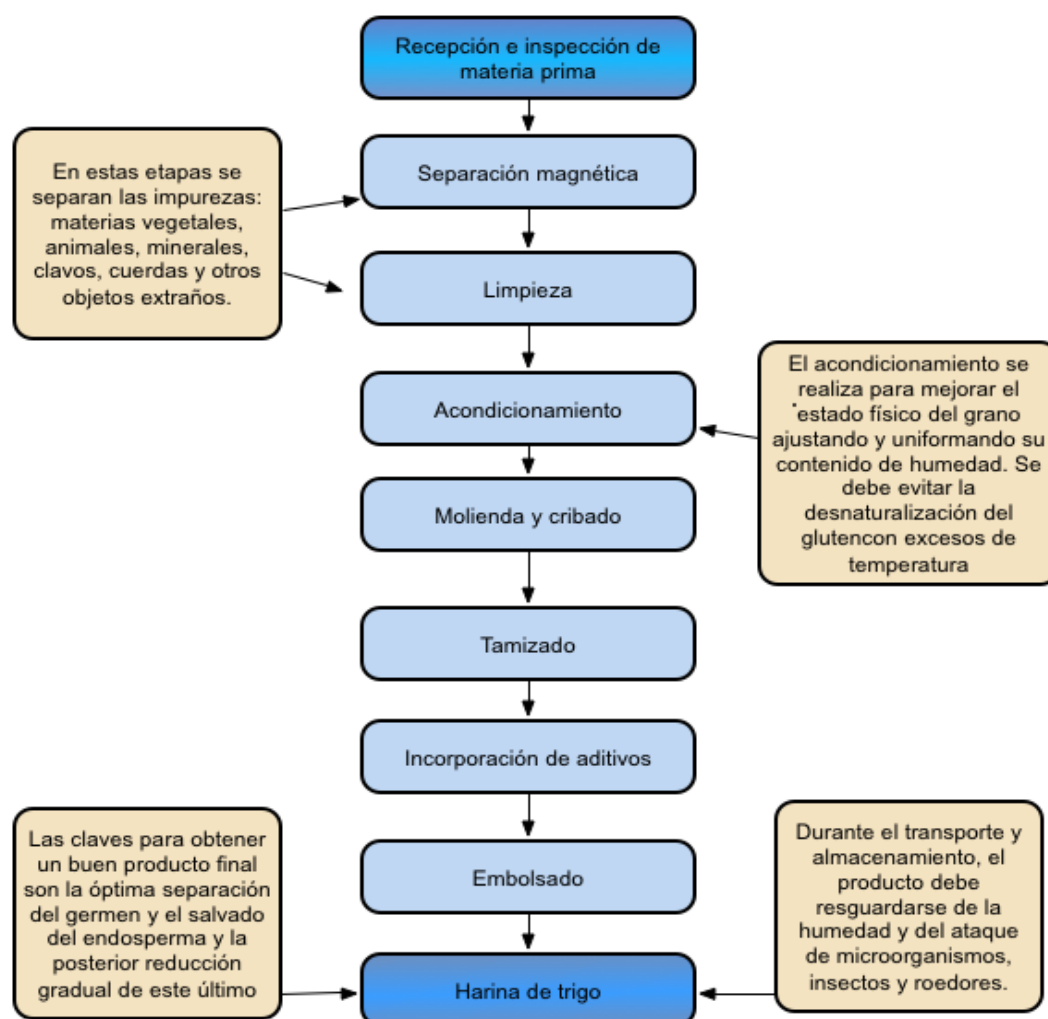


Figura 1.5 Esquema de la obtención de harina de trigo. Adaptado de:

<http://www.alimentosargentinos.gov.ar>

En el primer paso del proceso de obtención de la harina es importante realizar una limpieza grosera de los granos antes de la molienda de manera de eliminar impurezas. Se utilizan diversos sistemas: de imanes para eliminar partículas metálicas, cribas para desechar partículas de diferente tamaño del grano, aspiraciones para eliminar partículas livianas y mesas densimétricas para eliminar objetos más densos que el trigo.

El acondicionamiento consiste en humedecer los granos con el fin de facilitar la eliminación del salvado y separación del germen, la humedad varía de 14 a 17 % según el tipo de trigo. Una vez acondicionados, los granos pasan por un proceso de trituración a través de un sistema de cilindros estriados con el objetivo de separar el endosperma del salvado.

Las distintas fracciones serán separadas y pasarán, de acuerdo a sus características, nuevamente por cilindros de trituración o bien por cilindros de compresión (lisos) hasta obtener el tamaño de partícula deseado, que corresponde al de la harina propiamente dicha.

Una composición media de harina es: almidón 70- 75 % (principalmente almidón), proteínas 10-12 %, humedad 14%, lípidos 2 %, polisacáridos no almidonosos (fibra) 2-3 %, cenizas 0,5 % (Goesaert y col. 2005).

En nuestro país, con el objeto de paliar deficiencias nutricionales detectadas en la población, es obligatorio antes del embolsado y almacenado de la harina la incorporación de ciertas vitaminas y minerales. Según la ley N° 25.630, la harina será adicionada con hierro (sulfato ferroso 30 mg/Kg), ácido fólico (2,2 mg/Kg), tiamina (mononitrato de tiamina 6,3 mg/Kg), riboflavina (1,3 mg/Kg) y niacina (nicotinamida 13,0 mg/Kg) (ANMAT 2010)

Las harinas obtenidas según lo descripto se tipifican según el CAA (Tabla 1.1).

Como se observa, las cenizas decrecen con el número de ceros asignado, o sea que una harina más refinada, que corresponde a un menor grado de extracción o rendimiento molinero (g de harina obtenidos cada 100 g de grano) es aquella con mayor número de ceros. La disminución de las

cenizas obedece al hecho de que una harina más refinada ha perdido en mayor grado las cubiertas que son la principal fuente de aporte mineral.

Tabla 1.1 Tipificación de las harinas según el Código Alimentario Argentino

Harina tipo	Humedad g/100 g	Cenizas g/100 g	Absorción g/100 g	Volumen pan (cm ³)
	Máximo	Máximo		Mínimo
0000	15,0	0,492	56-62	550
000	15,0	0,650	57-63	520
00	14,7	0,678	58-65	500
0	14,7	0,873	60-67	475
½0	14,5	1,350	-	-

La harina 000 es la que se utiliza generalmente en la elaboración de pan “tipo francés” que es uno de los más ampliamente difundidos en nuestro país. La calidad panadera de la harina dependerá fundamentalmente de su composición y principalmente de la calidad y cantidad de proteínas (gliadinas y gluteninas) presente en la misma.

2 Componentes de la harina de trigo

2.1 Almidón

El almidón está presente en el endosperma del grano; representa el componente principal de la harina (alrededor del 70 %). Está constituido por dos polisacáridos de glucosa:

- Amilosa (25 % del total): polímero de cadena lineal de D-glucosa con uniones $\alpha,1\rightarrow4$, que puede alcanzar hasta 4000 unidades de glucosa. Tiene un peso molecular que varía de 10^5 a 10^6 Da.
- Amilopectina (75 % del total): polímero de cadena ramificada de D-glucosa con uniones $\alpha,1\rightarrow4$ unidas por enlaces $\alpha,1\rightarrow6$ en los puntos de ramificaciones. Tienen un peso molecular mayor a 10^8 Da.

Estos polisacáridos se encuentran formando gránulos (Figura 1.6 a) en donde las cadenas se disponen en forma radial, interactuando entre si a través de uniones puente de hidrógeno y con otros componentes naturales presentes como lípidos (Figura 1.6 b). Los gránulos de almidón son birrefringentes y muestran la característica Cruz de Malta bajo luz polarizada (Greenwood, 1976). Esto indica un grado de orden en el gránulo y una orientación de las macromoléculas perpendiculares a la superficie del granulo. El almidón es considerado un material semicristalino por presentar zonas amorfas (menos densas, que contienen amilosa y amilopectina desordenadas) y zonas cristalinas (ordenadas, atribuidas principalmente a la estructura de la amilopectina).

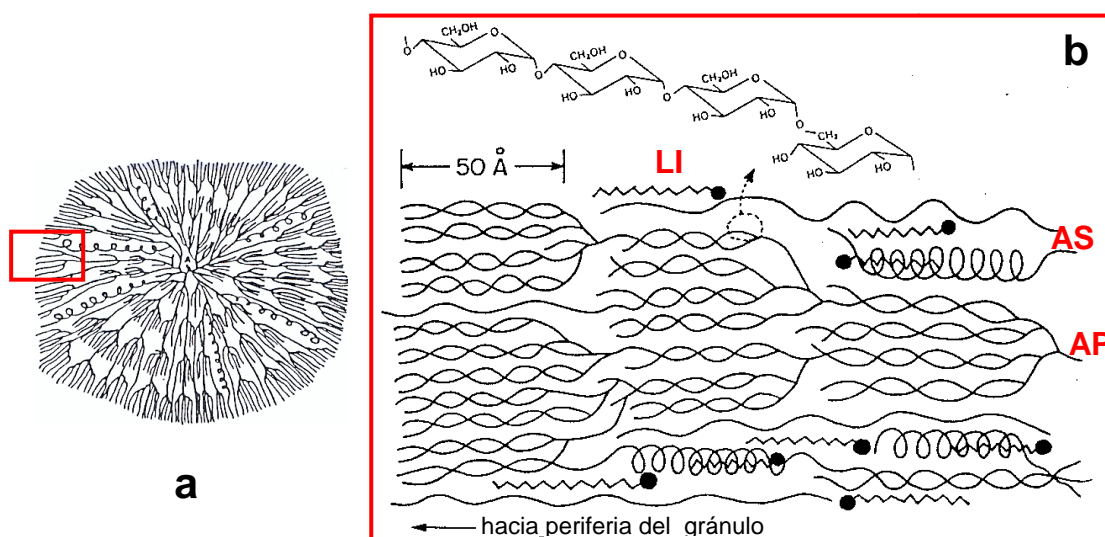


Figura 1.6 a) Estructura del gránulo de almidón **b)** Organización molecular de los componentes del gránulo de almidón. LI: lípidos, AS: amilosa, AP: amilopectina. Fuente: Biliaderis (1992)

De acuerdo a su origen, los gránulos de almidón presentan un tamaño que varía de 2 a 100 μm . De acuerdo a su morfología, los gránulos pueden dividirse en dos grupos: los de tipo A que son largos y lenticulares, con un diámetro medio de 20 μm y los de tipo B que son esféricos y pequeños con un diámetro medio de 5 μm (Goesaert y col. 2005). Las proporciones de amilosa y amilopectina varían también de acuerdo a la fuente botánica, generalmente entre 18 y 33% para la amilosa y entre 72 y 82% para la amilopectina (Buléon y col. 1998) aunque existen almidones con elevados porcentajes de amilosa (amilomaíz, 65-70%) (Whistler, 1984) y almidones céreos constituidos casi en su totalidad por amilopectina (Shannon y Garwood, 1984). Los almidones también son clasificables de acuerdo a los patrones de rayos X: patrones tipo A de almidones de granos de cereales tales como maíz, trigo y arroz; patrones tipo B característicos de tubérculos, frutas y tallos, como papa, sago y banana. El patrón tipo C es intermedio entre los patrones A y B y corresponde al almidón que se encuentra en algunas leguminosas (French, 1984). El almidón es insoluble en agua fría; pero es capaz de retener hasta un tercio de su peso en agua. El agua se adhiere a la superficie de los gránulos, parte se introduce por los poros y conduce a un hinchamiento del gránulo.

Cuando son sometidos a tratamientos térmicos, los gránulos de almidón experimentan distintas transiciones: gelatinización, gelación y retrogradación. En la Figura 1.7 se puede observar un esquema de los cambios que se producen en el almidón durante el calentamiento. La gelatinización se produce cuando los gránulos son sometidos a calentamiento en presencia de suficiente cantidad de agua; el gránulo se hidrata aumentando varias veces su volumen, plastificándose las zonas amorfas y fundiendo posteriormente las cristalinas (Zobel, 1984); se produce además la liberación parcial de los componentes granulares (amilosa).

La gelatinización se caracteriza por un incremento de la susceptibilidad a la degradación enzimática (Greenwood, 1976) por parte de las enzimas (α y β

amilasa) que van a degradar hasta un 10% del almidón a dextrina, maltosa y glucosa que servirán de sustrato a las levaduras durante la fermentación.

Otra característica de esta transición es la pérdida de birrefringencia de los gránulos. Al enfriarse, se forma el gel de almidón, constituido por una red de amilosa interpenetrada por los gránulos hinchados y parcialmente fragmentados, que mantienen en su interior las moléculas de amilopectina.

A medida que transcurre el tiempo a partir de la formación del gel, comienza a producirse un fenómeno de cristalización, denominado retrogradación. La retrogradación del almidón es una transición en la que las moléculas gelatinizadas del almidón, en estado completamente amorfo, se reasocian para formar una estructura cristalina de doble hélices (Pateras, 2003).

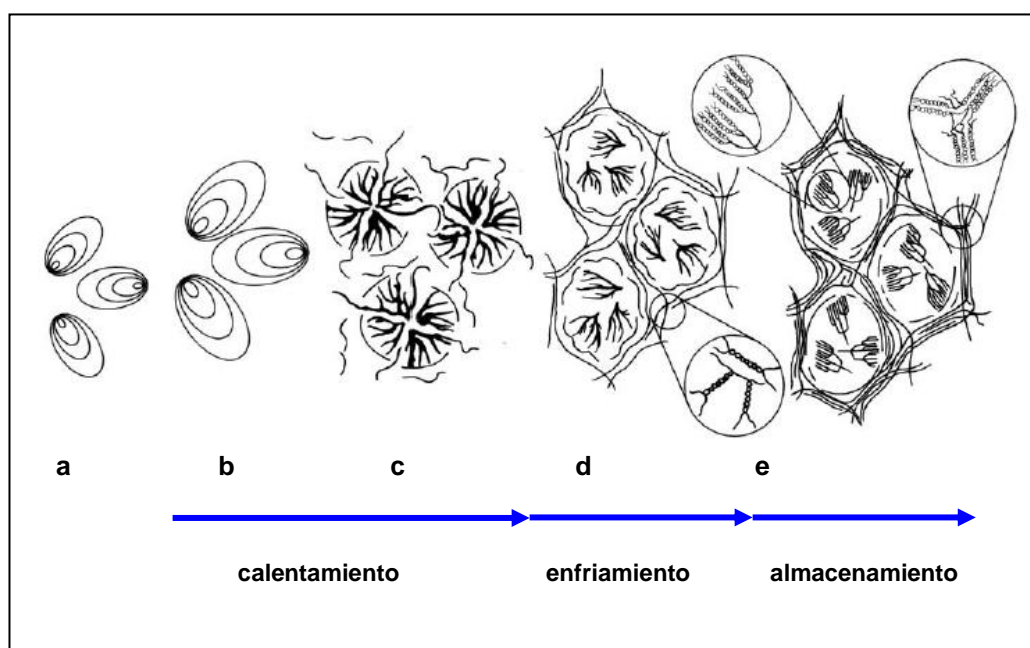


Figura 1.7 Representación esquemática de los cambios ocurridos en la mezclas almidón-agua durante el calentamiento. Gránulos de almidón nativo (a); Gelatinización: hinchamiento (b) y liberación de amilosa y parcial disrupción de los gránulos durante el calentamiento (c); Gelación: formación de la red de amilosa durante el enfriamiento de la pasta (d); Retrogradación: cristalización de moléculas de amilopectina dentro de los gránulos y de amilosa fuera de ellos durante el almacenamiento (e). Adaptado de Goesaert y col. (2005).

En este proceso, intervienen tanto la amilosa como la amilopectina. La recristalización de amilosa es irreversible a temperaturas inferiores a 100°C y es el proceso que predomina en la etapa inicial de retrogradación, verificándose un aumento de cristalinidad y de consistencia del gel de almidón. Por otro lado, la recristalización de amilopectina es un fenómeno a más largo plazo, reversible por debajo de los 100°C, que ocasiona el aumento de rigidez del gránulo y el consiguiente refuerzo de la matriz de amilosa del gel (Miles y col., 1985). Para que ocurra este proceso, que depende de la difusión de las moléculas, el almidón debe tener disponibilidad de humedad.

En el proceso de panificación, los gránulos son relativamente inertes durante el amasado, pero influyen en la reología de la masa por su carácter de “relleno” en la matriz estructurada por el gluten.

Durante la cocción, como el nivel de agua en la masa panaria es de aproximadamente 55%, el proceso descrito de gelatinización queda restringido, produciéndose sólo parcialmente; aun así es importante porque produce la fijación de la estructura alveolar de la miga, determinando el final de la expansión en el horneado (Eliasson, 2003). Desde el punto de vista nutricional este proceso hace a las moléculas susceptibles al ataque enzimático y por lo tanto, digerible al almidón.

Respecto a la retrogradación, que es responsable del envejecimiento del pan, en el pan fresco las cadenas ramificadas de la amilopectina están desplegadas y se agregan gradualmente alineándose unas con otras mediante enlaces puente de hidrógeno. Este alineamiento molecular produce una rigidez mayor de la estructura interna de los gránulos de almidón hinchados causando el endurecimiento y pérdida de elasticidad de la miga (Pateras, 2003).

2.2 Proteínas

Tradicionalmente, las proteínas presentes en la harina de trigo se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad: 1) albúminas, solubles en agua, 2) globulinas, solubles en solución salina diluida, 3) gliadinas (prolaminas), solubles en alcohol y 4) gluteninas (glutelinas), solubles en soluciones ácidas o básicas diluidas (Osborne, 1914).

Entre estas proteínas, tienen particular importancia las gliadinas y gluteninas, que se encuentran localizadas en cuerpos proteicos en el endosperma del grano. Durante el amasado en presencia de suficiente cantidad de agua se produce la ruptura de estos cuerpos proteicos y se genera una red compleja, estabilizada por distintos tipos de uniones, que se denomina gluten y es responsable de las características viscoelásticas de la masa de harina de trigo (Shewry y col. 2002; Wieser, 2006). Las proteínas formadoras de gluten constituyen entre un 80-85% del total de las proteínas. Las albúminas y globulinas, que representan entre un 15-20% del total de las proteínas, no forman parte del gluten.

2.2.1 Gliadinas

Las gliadinas son proteínas relativamente pequeñas, hidrofóbicas, con un peso molecular que va de 30.000 a 55.000 Da. Contienen una única cadena polipeptídica y los puentes disulfuro que forman son intramoleculares, por lo que se trata de proteínas monoméricas. Las gliadinas constituyen aproximadamente el 30 % de las proteínas totales. En la red de gluten se asocian a través de uniones no covalentes con las gluteninas.

Inicialmente, estas proteínas se clasificaron por electroforesis a bajos pH, en 4 grupos: α , β , γ , ω -gliadinas en orden decreciente de movilidad. Estudios recientes han demostrado, sin embargo, que las α y β -gliadinas están estrechamente relacionadas estructuralmente y por lo tanto ambos grupos se incluyen bajo la denominación única de α/β -gliadinas (Shewry, 2003). Métodos como los de electroforesis en dos dimensiones o cromatografía líquida de alta performance en fase reversa (RP-HPLC) han permitido la

separación de gliadinas en más de 100 componentes agrupables en cuatro fracciones: ω 5-, ω 1,2-, α/β - y γ gliadinas. Dentro de cada grupo hay pequeñas diferencias por inserción, sustitución o delección de aminoácidos.

Las ω -gliadinas tienen pesos moleculares comprendidos entre 40.000 y 55.000 Da (Wieser, 1996) y su estructura se basa casi totalmente en secuencias repetitivas ricas en glutamina y prolina. Estos aminoácidos, junto con la fenilalanina representan un 80% de la composición aminoacídica total. Las ω 5- gliadinas tienen pesos moleculares mayores (alrededor de 50000 Da) que las ω 1,2- gliadinas (alrededor de 40000 Da) (Wieser, 2007). Una característica común a todas ellas es la ausencia de cisteína por lo que no pueden formar puentes disulfuro, como sí lo pueden hacer las α/β - y γ gliadinas.

Las α/β y γ -gliadinas tienen un rango común de pesos moleculares, de 28.000 hasta 35.000 Da. Las proporciones de glutamina y prolina son mucho más bajas que las encontradas en las ω -gliadinas. Las α/β y γ -gliadinas difieren significativamente entre si en el contenido de unos pocos aminoácidos: ácido aspártico, prolina, metionina, tirosina, fenilalanina y triptófano (Bietz y col. 1977). Tanto las α/β como las γ gliadinas tienen dominios N- y C-terminal claramente diferenciados. El N-terminal tiene secuencias repetitivas diferentes según se trate de α/β ó γ gliadinas. Por el contrario, dentro de los dominios C-terminal ambos grupos, α/β y γ , son homólogos: presentan secuencias no repetitivas y tienen menos glutamina y prolina que el dominio N-terminal. Estas gliadinas, denominadas “ricas en azufre” contienen entre 6 grupos cisteína (las α/β -gliadinas) y 8 grupos cisteína (las γ -gliadinas), localizados en el dominio C-terminal y que forman tres ó cuatro puentes disulfuro intracatenarios, respectivamente (Grosch y Wieser, 1999).

Respecto a la estructura secundaria, los dominios N-terminales de α/β y γ -gliadinas están caracterizados por conformación en espiral β , similar a las ω -

gliadinas. En cambio, el dominio C-terminal contiene una proporción importante de estructuras α -hélice y hojas plegadas- β .

2.2.2 Gluteninas

Sus masa moleculares son mayores que las de las gliadinas y al poder formar uniones covalentes entre sí por puentes disulfuro intermoleculares, dan lugar a la formación de macropolímeros, de más de 10^6 Da (Wieser y col. 2006). Se las denomina por este motivo, proteínas agregativas o poliméricas. Constituyen aproximadamente el 40 % de las proteínas totales. Después de la reducción de los puentes disulfuro, las subunidades resultantes muestran una solubilidad similar a las gliadinas.

Se puede identificar dos grupos: las subunidades de gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS), cuyas masas moleculares se encuentran entre los 40.000 y 55.000 Da y que son mayoritarias constituyendo alrededor del 20 % de las proteínas de gluten y las subunidades de alto peso molecular (HMW-GS), con masas en el rango de 80.000 a 120.000 Da, que representan alrededor del 10 % de las proteínas de gluten. Ambos tipos de subunidades son capaces de formar puentes –S-S- inter e intracatenarios (Wieser, 2007). La composición aminoacídica de las gluteninas es muy similar a la de las gliadinas.

Las LMW-GS están relacionadas con las α/β y γ -gliadinas, tanto en peso molecular como en composición aminoacídica. El dominio N-terminal contiene secuencias repetitivas ricas en glutamina y prolamina, mientras que el dominio C-terminal es homólogo al de α/β y γ -gliadinas. Contienen 8 residuos cisteína en posiciones homólogas a las de gliadinas; 6 de ellos pueden formar puentes –S-S- intracatenarios y dos no pueden hacerlo probablemente por razones estéricas, dando lugar a puentes intercatenarios (Wieser, 2007). De acuerdo a su movilidad electroforética se han clasificado en tres subgrupos: D, C, B (de menor a mayor movilidad). Las tipo D, minoritarias, están estrechamente asociadas desde el punto de vista

estructural con las ω -gliadinas, de las que difieren por la presencia de un residuo cisteína, lo que les permite incorporarse a través de una unión –S-S– a la red polimérica.

Las HMW-GS constituyen las proteínas minoritarias dentro del gluten. Cada variedad de trigo contiene de 3 a 5 tipos distintos de estas subunidades, agrupables en dos tipos diferentes: tipo x y tipo y, con masas moleculares entre 83000-88000 Da y 67000-74000 Da, respectivamente. La nomenclatura de estas subunidades responde además a su codificación genética (A, B, D) y su movilidad electroforética (1-12). Estas proteínas presentan tres dominios estructurales: N-terminal (80 a 105 residuos), un dominio repetitivo central (480-700 residuos) y un dominio C-terminal (42 residuos) (Shewry y col., 1992). Los dominios terminales presentan grupos cargados y allí están localizados todos o casi todos los residuos cisteína, responsables de la capacidad de estas proteínas de formar puentes disulfuro. El dominio central es altamente repetitivo, presentando un esqueleto de hexapeptidos (QQPGQG) que se intercalan con secuencias repetitivas de otros hexapéptidos o tripéptidos. Las diferencias principales entre los tipos x e y radican en los dominios N-terminal y central. En particular, las tipo y tienen 5 cisteínas en el dominio N-terminal, uno en el central y otro en el C-terminal mientras que las tipo x tienen, salvo la subunidad Dx5 que tiene una cisteína adicional, 4 cisteínas: 3 en el dominio N-terminal y 1 en el dominio C-terminal (Shewry y Tatham, 1997).

Respecto a la estructura secundaria, el dominio central muestra una conformación de “espiral laxa (giro)” tipo β -reverso, considerada la base de la elasticidad del gluten, mientras que los dominios terminales presentan estructuras globulares con presencia de α -hélices.

La calidad panadera de una harina está estrechamente relacionada con el tipo de subunidades de gluteninas HMW. El trigo pan es hexaploide, hallándose 2 genes de HMW (codificando una subunidad tipo x o una tipo y) en cada cromosoma 1A, 1B y 1D. Sin embargo el silenciamiento de genes específicos conduce a una variación en el número de subunidades (entre 3 y

5 variaciones alelicas). Dentro de las gluteninas, las de tipo x tienen más influencia en las propiedades de la masa que las de tipo y. Dentro de las subunidades, las Dx5 y Bx7 contribuyen particularmente a la calidad de la masa y del pan (Wieser, 2007).

Se ha podido correlacionar la calidad panadera con las gluteninas de alta masa molecular expresadas, asignándoseles puntajes de calidad a las subunidades, aunque esto no permite predecir en todos los casos la calidad panadera ya que las gluteninas de HMW no son las únicas determinantes de la misma. Se estima que estas subunidades pueden explicar entre el 45 y el 70 % de variación en la calidad panadera de trigos europeos (Payne y col. 1987; Payne y col. 1988).

En base a estas características estructurales, y si bien la clasificación de Osborne sigue siendo ampliamente utilizada, se ha propuesto una nueva clasificación de las proteínas formadoras de gluten basada en las similitudes estructurales mencionadas, en la composición aminoacídica y en particular en la presencia de residuos cisteína. Esta clasificación, en la que tanto gliadinas como gluteninas son consideradas prolaminas se muestra en el esquema de la Figura 1.8 (Shewry, 2003).

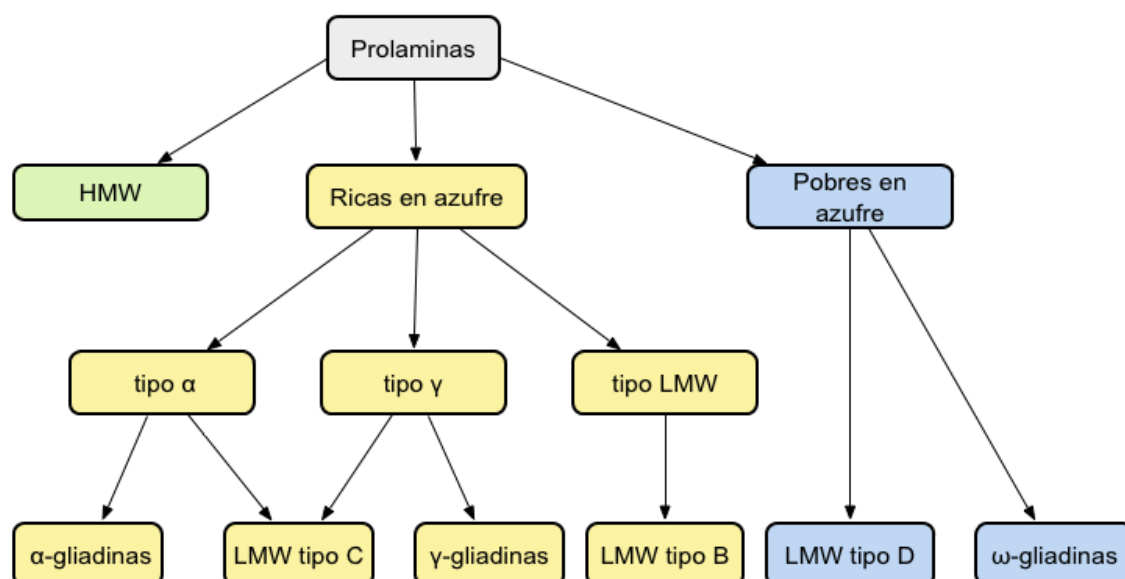


Figura 1.8 Esquema de clasificación de las proteínas de gluten basado en las secuencias aminoacídicas (adaptado de Shewry 2003)

2.2.3 Red de gluten y su relación con la aptitud panadera

Gliadinas y gluteninas conforman durante el proceso de amasado una red estabilizada por distintos tipos de uniones, principalmente puentes disulfuro. Entre los principales determinantes de la calidad de masa se encuentra la distribución de pesos moleculares de las gluteninas, gobernada a su vez por la distribución de $-S-S-$, que dependerá de factores genéticos (tipo de subunidades, relación HMW-GS/LMW-GS, cantidad de terminadores de polimerización), factores ambientales (deficiencia de S, condiciones de stress térmico o hídrico), potencial redox (presencia de agentes oxidantes o reductores). El esqueleto de HMW-GS está estabilizado por uniones cabeza-cola, al menos cuatro cisteínas contribuyen a las ramificaciones del esqueleto. Las subunidades LMW-GS forman también polímeros lineales y los terminadores de polimerización suelen ser con un número impar de cisteínas. Se ha encontrado que las relaciones HMW-GS/LMW-GS es alrededor de 1:2 y de tipo $x/\text{tipo } y$ alrededor 2,5:1. La unidad básica del

polímero parece ser 2 HMW-GS tipo y, 4 LMW-GS tipo x y alrededor de 30 subunidades LMW-GS unidas covalentemente por enlaces –S-S- llegando a una masa molecular de 1,5 millones. El más grande de estos polímeros (macropolímero de glutenina) puede incluir más de 10 de estas unidades básicas (Wieser y col. 2007).

En la Figura 1.9 se observa el modelo ampliamente aceptado de estructura del gluten, donde las subunidades HMW-GS forman el esqueleto elástico, a través de uniones puentes disulfuro, las subunidades LMW-GS constituyen las ramificaciones y las gliadinas se asocian a través de uniones no covalentes (Shewry y col. 2001).

En las características reológicas de la masa influyen tanto la cantidad y calidad de las proteínas de gluten presentes como la cantidad de agua que son capaces de absorber. Desde el punto de vista de su comportamiento reológico, la masa de harina de trigo y agua constituye un sistema viscoelástico, donde el esqueleto de gluteninas contribuye a la elasticidad o tenacidad y las gliadinas a la viscosidad o extensibilidad (Cornec y col. 1994; Khatkar y col. 1995).

El tipo de trigo tiene especial influencia sobre el contenido y tipo de proteínas y con ello sobre la cantidad y calidad de gluten; también influye la época de cosecha y grado de extracción (rendimiento de molienda). La cantidad de gluten formado en el amasado es lo que determina que la harina sea “fuerte” o “débil”. La harina fuerte es rica en gluten, tiene mayor capacidad de absorción de agua, dando masas consistentes y elásticas, panes de buen aspecto, textura y volumen satisfactorios.

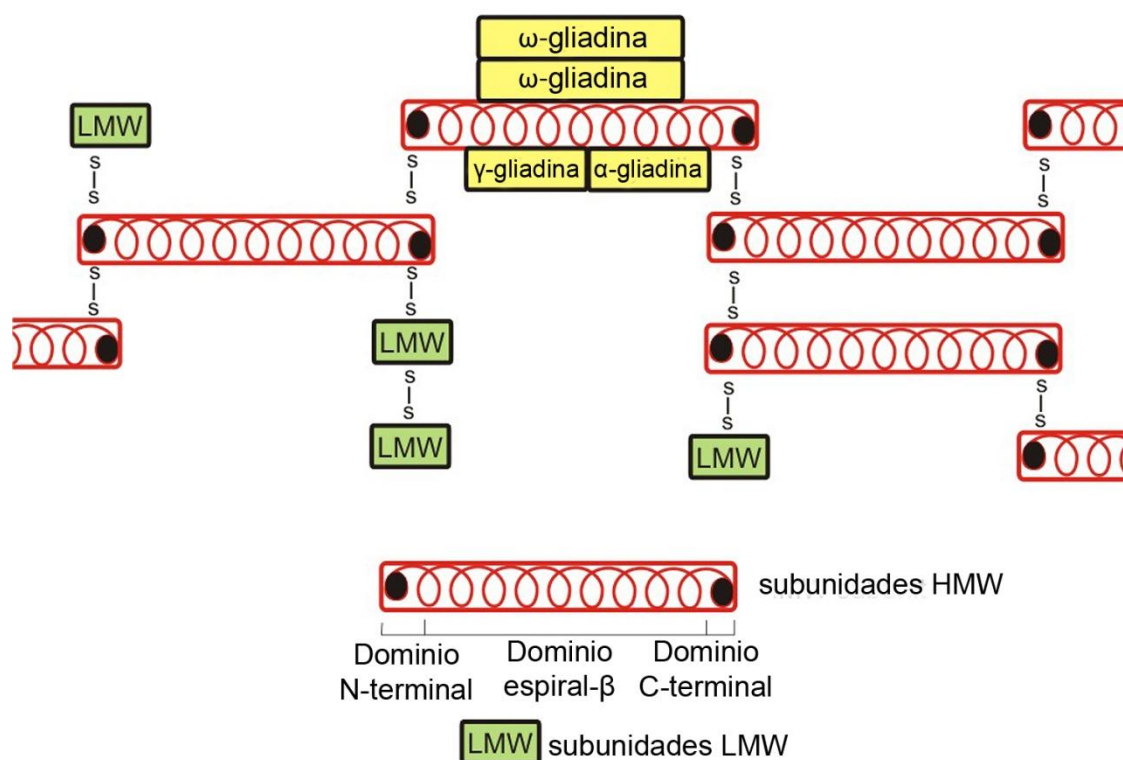


Figura 1.9 Esquema de la estructura de la red de gluten. Adaptado de Shewry y col. (2001).

La harina débil es pobre en gluten, absorbe poca agua, forma masas poco elásticas y con tendencia a colapsar durante la fermentación, dando panes de menor volumen y de textura de miga deficiente. Estas harinas no son aptas para fabricar pan pero sí para galletas u otros productos que no requieran levado.

2.3 Lípidos

Los lípidos presentes en la harina proceden de los residuos de las envolturas y de partículas del germen. El contenido de materia grasa dependerá por lo tanto del grado de extracción de la harina. Esto influye en el almacenamiento

ya que mientras mayor sea su contenido en grasa más fácilmente se enranciará la harina.

La harina de trigo contiene 1,5 a 2,5 % de lípidos, el 75 % de los cuales no están ligados al almidón, siendo principalmente triglicéridos y digalactosil-diacilgliceridos. El 25 % restante está unido a almidón y su constituyentes son los lisofosfátidos. Cuando se amasa la harina los glicolípidos se unen completamente al gluten en tanto que los otros lípidos lo hacen sólo en un 70-80 % (Belitz y Grosch, 1988).

En pruebas de horneado con harinas de diferentes variedades de trigo la adición de lípidos polares proporciona un aumento de volumen. El principal glicolípido de la harina, el digalactosil-diacilglicerido, es particularmente eficaz.

2.4 Fibra

En el grano existen naturalmente polisacáridos no almidonosos denominados pentosanos (básicamente arabinoxilanos y arabinogalactanos), que tienen la habilidad de retener agua y formar soluciones viscosas o geles por uniones covalentes que afectarían la distribución de humedad entre los constituyentes de la masa, alterando así la estructura del gluten y las propiedades reológicas de la masa (Kim y D'Appolonia, 1977). Se ha postulado que el contenido de arabinoxilanos solubles de las harinas correlaciona positivamente con la calidad del pan ya que actúan disminuyendo la velocidad de difusión del CO₂ en la masa estabilizando las celdas de gas. Además, incrementan la viscosidad de la fase acuosa de la masa aumentando su estabilidad e incluso mejoran las características del pan, como el volumen de pan, la firmeza y estructura de la miga (Hoseney, 1984; Gan y col., 1995). Van Oort y col., 1995 postularon que durante el proceso de panificación el contenido total de arabinoxilanos insolubles en agua causa un impacto negativo ya que actúa limitando la agregación del gluten debido a impedimentos estéricos. Asimismo absorben

una gran cantidad de agua que dejan de estar disponible para el desarrollo del gluten y causan coalescencia de las celdas de gas resultando una pobre calidad del pan (Courtin & Delcour, 2002; Courtin y col. 1999).

3 Panificación

3.1 Cambios microestructurales durante el proceso de panificación

Según el Código Alimentario Argentino, Cap. IX, art. 725:

“Con la denominación genérica de Pan, se entiende el producto obtenido por la cocción en hornos y a temperatura conveniente de una masa fermentada o no, hecha con harina y agua potable, con o sin el agregado de levadura, con o sin la adición de sal, con o sin la adición de otras sustancias permitidas para esta clase de productos alimenticios”.

Existen diferentes tipos de panes, pero el más consumido en nuestro país es el denominado “pan blanco o “tipo francés”, cuya formulación es relativamente simple. Los ingredientes básicos de este pan son: harina, agua, sal y levadura, los cuales son sometidos a un proceso de mezclado y amasado, fermentación y cocción a altas temperaturas (mayores a 200 °C). Cuando es necesario, se añaden aditivos para ajustar la calidad de la harina a fin de asegurar que el producto final cumpla con los estándares existentes. El proceso de **elaboración de masa panaria** presenta variantes pero los pasos esenciales involucrados se resumen a continuación.

El **amasado** consiste básicamente en el mezclado de agua, harina, sal y levadura hasta obtener una consistencia óptima. En esta etapa de absorción de agua por parte de los componentes principales de la harina (almidón y principalmente proteína) se producen cambios estructurales en dichos macropolímeros. Por ensayos de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) sobre subunidades de glutenina de alto peso molecular, proteínas modelo y

péptidos se ha concluido que al hidratarse la proteína, ésta adquiere mayor movilidad y forma estructuras hoja plegada β ; la hidratación posterior aumenta la movilidad acompañada por la formación de estructuras espiral β a expensas de la hoja plegada. Estos cambios de estructura secundaria con el grado de hidratación se han plasmado en un modelo denominado de “bucles y lazos” (Shewry y col. 2001).

En la Figura 1.10 se observa la secuencia de cambios derivados del incremento en la hidratación. En un comienzo, a bajos niveles de hidratación hay fuerte interacción proteína-proteína a través de uniones puente de hidrógeno entre residuos de glutamina. A medida que la hidratación aumenta hay formación de más zonas hidratadas (bucles), y a altos niveles de hidratación se forman regiones donde la interacción entre cadenas se ha discontinuado, de gran movilidad y que presentan conformaciones espiral β .

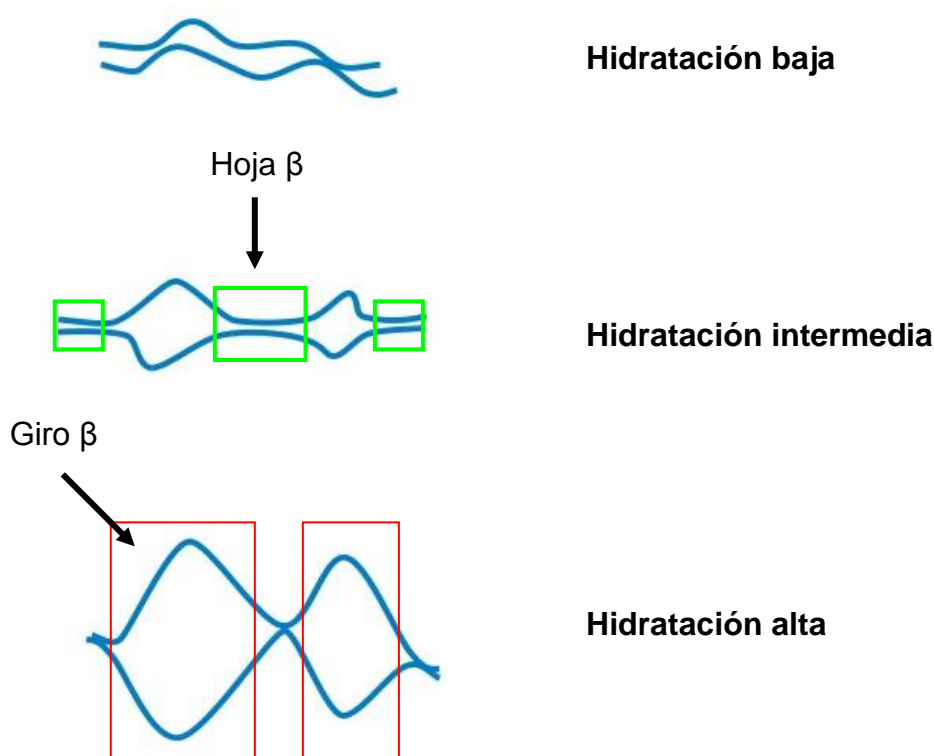


Figura 1.10 Efecto del grado de hidratación en la proporción de “bucles” respecto a los “lazos” en HMW-GS. Adaptado de Shewry y col. (2001).

El **amasado** aporta energía mecánica lo cual lleva a la formación y reagrupamiento de los enlaces disulfuro y a un cambio en la conformación de las proteínas de la harina, que pasan a una estructura fibrilar transformándose en la red de gluten en la cual se encuentran incluidos los gránulos de almidón. En este proceso las subunidades de glutenina muestran un estiramiento de los “bucles” y las regiones de “lazos” (en estructura tipo cremallera) se separan y se transforman en cadenas rígidas extendidas a medida que el proceso avanza (Figura 1.11).

Se presume que por este mecanismo la masa almacena energía elástica y se puede así explicar la resistencia durante el proceso de mezclado. El agua juega el rol de agente plastificante ya que la deformación de los “bucles” requeriría menos energía que la separación de los “lazos” por lo que un incremento del agua en la masa conduciría a un sistema más deformable (Shewry y col. 2001).

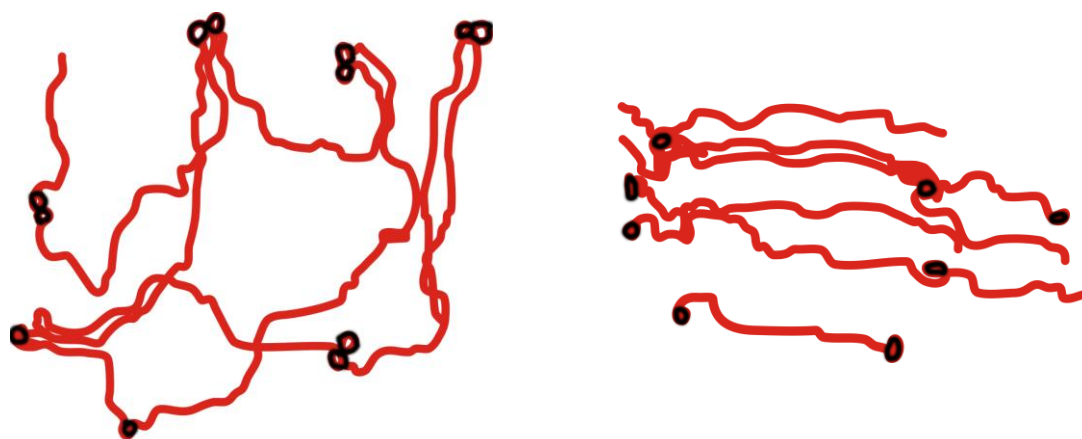


Figura 1.11 Conformación de las subunidades de glutenina de alto PM en la matriz de la masa a) antes de la extensión b) después de la extensión (●) puentes disulfuro. Adaptado de Shewry y col. (2001).

Durante el amasado se producen numerosas interacciones, no sólo entre las proteínas y el agua para formar la red de gluten sino también interacciones de otros componentes presentes en la harina: almidón, polisacáridos no almidonosos (arabinosilanos, arabinogalactanos) y lípidos (neutros y polares: fosfo y glicolípidos) (Carr y col. 1992; Bettge y Morris, 2000; Lee y col. 2001). Además, se incorporan burbujas de aire en el interior de la masa como núcleos gaseosos que cumplirán un rol importante durante la fermentación. Las características elásticas de la red de gluten favorecen la retención del gas producido en la fermentación pero a la vez la matriz debe ser lo suficientemente extensible para permitir que leve la pieza (Couvain, 1998).

La **fermentación** se produce en el periodo de reposo de la masa una vez que las piezas son armadas, continuando la actividad de la levadura a temperatura (30°C) y humedad (85-90%) controladas. Para la fermentación de masas panarias se emplean levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de fermentar azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol (fermentación alcohólica o fermentación de levadura). Este proceso comprende todo el tiempo transcurrido desde el mezclado hasta que el pan entra al horno. En la fermentación hay dos etapas importantes, la producción y la retención de gas. El dióxido de carbono que se produce queda retenido en los pequeños alvéolos que se habían formado en la matriz proteica durante el amasado, provocando el crecimiento de los mismos y la expansión de la masa (Wiggins, 1998). Durante la fermentación se forman otros productos derivados de la actividad de la levadura tales como acetaldehído, sulfuro de metilo y etanol que contribuyen al desarrollo del flavor (aroma-sabor) (Belitz y Grosch, 1982).

El objetivo de la **cocción** es transformar la masa en un producto apetitoso y digerible. La temperatura de horno para la cocción del pan se fija normalmente entre 190 y 220 °C. Durante el desarrollo de la cocción se produce una disminución de la cantidad de agua de la masa, y por ello existe un aumento gradual de la temperatura sobre la superficie que provoca la formación de la corteza, cuyo espesor dependerá de la duración de esta

fase. La actividad de la levadura disminuye a medida que la masa se calienta, llegándose a la inactivación total cuando la temperatura alcanza los 55 °C. Cuando se alcanza una temperatura de 60 °C comienza la gelatinización del almidón y alrededor de 95°C se produce la desnaturalización de proteínas. En la corteza, que alcanza temperaturas más altas, se producen distintas reacciones: degradación del almidón a dextrinas, mono y disacáridos (glucosa, maltosa). La presencia de estos azúcares de bajo peso molecular confieren dulzor y además intervienen en reacciones de pardeamiento no enzimático (caramelización y reacción de Maillard) que producen el color característico de la superficie del pan y sustancias que confieren aroma. La 2-acetil-1-pirrolina es el compuesto aromático más potente de la corteza (Schieberle y col. 1985).

Durante el **enfriamiento** del pan se produce el endurecimiento de la superficie ocasionado por el escaso contenido de agua en la misma (entre 3 y 7 %). El almidón y las proteínas se encuentran en estado vítreo caracterizado por el término “corteza”. Por el contrario, el alto contenido de humedad del interior (entre 35 y 40 %) permite que la estructura macromolecular se comporte como un material gomoso, caracterizado por una textura esponjosa.

Este alto contenido de humedad de la misma es el responsable de la sensibilidad de la miga a los cambios que ocurren durante el **almacenamiento** (Cuq y col. 2003). La calidad del pan cambia durante su almacenamiento. La corteza pierde su carácter crujiente y su brillo, los compuestos del aroma del pan recién horneado se volatilizan. La miga se torna firme, pierde elasticidad y se deshace más fácilmente. Este endurecimiento de la miga se debe básicamente a la retrogradación del almidón que consiste en la realineación de las moléculas del amilosa y amilopectina pasando de una forma amorfa (estado gomoso) a una cristalina. La cristalización está favorecida por una transferencia de agua del gluten al almidón que facilita la difusión de las cadenas. Para mantener la

frescura del pan durante su conservación se adicionan a la masa aditivos tales que minimizan la migración de agua desde la miga hacia la corteza.

3.2 Mejoramiento de la calidad de la masa panaria: empleo de aditivos

Debido a las variaciones en calidad de las harinas, que se deben a diversas razones genéticas y ambientales que se encuentran interrelacionadas, es frecuente la necesidad de emplear aditivos mejoradores para lograr un producto de buen volumen, textura y aspecto. Tradicionalmente se empleaba el bromato de potasio hasta que al demostrarse su toxicidad fue prohibido a partir del año 1995 (resolución N°3/1995 del Ministerio de Salud de la Nación). Han sido demostrados en animales de laboratorio sus efectos tóxicos a nivel renal y óptico, retrasos en el desarrollo embrionario, acción carcinogénica así como efectos mutagénicos en cepas bacterianas (Giannuzzi, 2009).

A partir de entonces se ha diversificado el tipo de aditivos a emplear, y normalmente se combinan en mezclas, que se venden bajo nombres comerciales.

Permanentemente se lanzan al mercado nuevos aditivos que permiten mejorar la calidad de la masa y del producto final y prolongar la conservación de los productos de panificación.

Desde el punto de vista de su accionar, los aditivos pueden clasificarse en oxidantes, emulsionantes, enzimas e hidrocoloides.

Los **oxidantes** (ácido ascórbico, peróxido de calcio, iodato de calcio, entre otros) incrementan la elasticidad o tenacidad de la masa a través de la oxidación de los -SH generando puentes disulfuro (-S-S-).

Los **emulsionantes** (ésteres de ácido diacetil tartárico de mono y di glicéridos -DATEM, estearoil-2-lactil-lactato -SSL, entre otros) son moléculas anfifílicas que se localizan, por sus características, en la interfase entre diversos componentes (por ejemplo proteína y almidón) generando

interacciones que mejoran la maquinabilidad y extensibilidad de la masa rindiendo panes de mejor volumen y textura de miga.

Diversas **enzimas** mejoran la masa a través de diferentes mecanismos: La transglutaminasa cataliza el entrecruzamiento de proteínas mediante enlaces isopeptídicos intra e intermoleculares. La pentosanasa actúa sobre los arabinoxilanos de la masa reduciendo su tamaño molecular y solubilizándolos, lo que estabilizaría las celdas de gas por incremento de la viscosidad de la fase acuosa. La glucosaoxidasa favorece la oxidación de los grupos –SH por formación de peróxido de hidrógeno (Steffolani, 2010).

Finalmente, los **hidrocoloides**, en particular los polisacáridos, de uso muy difundido en diversas formulaciones alimentarias por su capacidad espesante y gelificante, han sido más recientemente aplicados en masa panaria, y tienen diverso efecto de acuerdo a sus características fisicoquímicas, aunque no están bien establecidos sus mecanismos de acción.

Se analizarán algunas características generales de estos últimos aditivos y en particular de aquellos que serán utilizados en el presente trabajo.

4 Hidrocoloides

4.1 Clasificación y aplicaciones

Los hidrocoloides desde el punto de vista químico son macromoléculas hidrofílicas: hidratos de carbono de alto peso molecular y proteínas de diferente origen. Los primeros se pueden clasificar en diferentes grupos: exudados de vegetales; extractos de algas marinas, de frutas y de huesos; harinas de leguminosas; obtenidos por fermentación o biosíntesis y los de síntesis química. En la Figura 1.12 se detalla una clasificación de estas macromoléculas.

Por estas razones tienen un variado uso en la industria alimentaria como aditivos (CAA 2005; Glicksman, 1982). Algunos ejemplos de su uso son: como mejorador de textura de alimentos, agentes inhibidores de cristalización de azúcares (en heladería) y de retrogradación del almidón, incremento en la retención de humedad, prolongación de la vida útil del

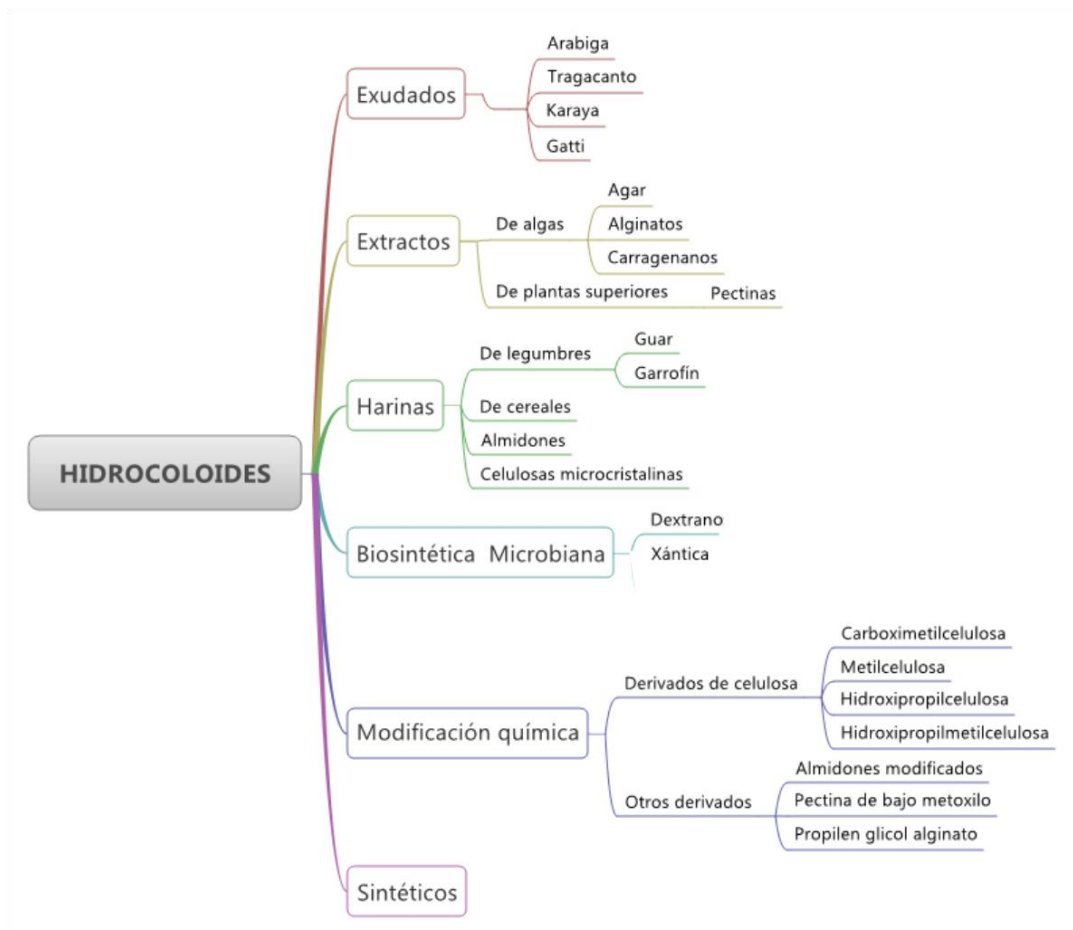


Figura 1.12 Clasificación de los hidrocoloides según su origen. Adaptado de Glicksman (1982)

producto (Ferrero y col. 1993, 1994; Mali y col. 2003). Asimismo, por ser sólo parcial o totalmente indigeribles en el tracto digestivo, integran desde el

punto de vista nutricional, la denominada fibra dietaria que cumple un rol fundamental en una dieta saludable (Lutz y col. 2009).

En panificación se han aplicado como sustituto del gluten en la formulación de panes libres de gluten ya que las gomas, al ser poliméricas, pueden en ciertos casos, imitar las propiedades viscoelásticas del gluten en la masa de pan (Rojas y col. 1999). Asimismo, la alta viscosidad desarrollada por algunas gomas mejoran la estabilidad de las masas durante el levado y cocción generando un mejor volumen final (Stauffer, 1990). Rosell y col. (2001) utilizaron en masas de harina de trigo κ -carragenano, alginato, goma xántica e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), informando que, en particular, la goma xántica y el alginato tenían un efecto reforzador de la masa, aumentando su tenacidad y siendo particularmente adecuados para procesos de fermentación prolongados. Por otro lado el κ -carragenano y la HPMC mejoraron el volumen específico y la textura de miga.

En el presente trabajo de tesis se emplearon como aditivos de masa panaria, algunos hidrocoloides cuya estructura y funcionalidad se detalla a continuación.

4.2 Goma Xántica

La goma xántica se obtiene mediante fermentación microbiana a partir de cultivos de la bacteria *Xanthomonas campestris*.

Esta bacteria, que crece naturalmente sobre una planta de la familia de las coles, libera al exterior este polisacárido, que forma una cobertura gruesa e hidrofílica alrededor de la pared celular cuya finalidad está aun en discusión: se ha sugerido que se trata de un sistema de adherencia a las partículas del suelo o la las plantas hospedadoras, o bien una cápsula para prevenir la deshidratación celular o evitar la infección por bacteriófagos, entre otras hipótesis.

A nivel industrial la goma se obtiene por fermentación en condiciones controladas de aireación, pH, temperatura y nutrientes adecuados (fosfato, magnesio, amonio entre otros); en estas condiciones la producción del exopolisacárido procede mucho más rápidamente que en el medio natural. Finalizada la fermentación se pasteuriza el medio y se recupera la goma por precipitación con alcohol isopropílico. El polisacárido es secado y molido a la granulometría adecuada. Las células no viables quedan en el preparado y son las que otorgan opacidad a las soluciones de esta goma.

La goma xántica es un heteropolisacárido de alto masa molecular ($2,5 \times 10^6$ Da). La cadena principal posee unidades de D-glucosa unidas por enlaces β 1 \rightarrow 4, o sea una estructura igual a la de la celulosa. La unidad repetitiva está formada por cinco monosacáridos: cada dos unidades de D-glucosa de la cadena central, aparece una cadena lateral trisacárida constituida por α -D-manosa unida a la cadena principal en la posición 3 de la glucosa, β -D-glucurónico unido a la manosa en la posición 2, y una unidad β -D-manosa terminal unida a la posición 4 del ácido glucurónico (Figura 1.13).

Sobre aproximadamente la mitad de las D-manosas terminales se encuentra un residuo de ácido pirúvico unido al azúcar por medio de un enlace cetálico a las posiciones 4 y 6. Además, la D-manosa no terminal puede estar sustituida en la posición 6 por un grupo acetilo. Estos sustituyentes confieren carga negativa a la molécula de goma xántica.

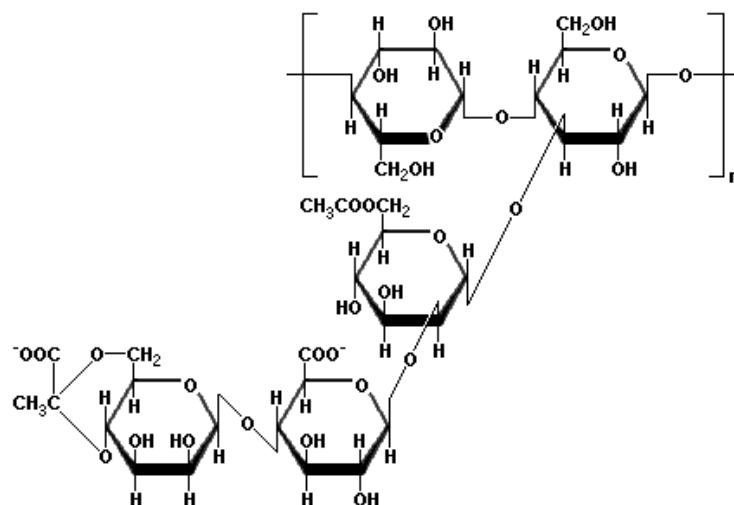


Figura 1.13 Secuencia repetitiva de la goma xántica.

Fuente: Glicksman (1982)

La estructura secundaria de esta macromolécula es una hélice formada por cinco unidades repetitivas, estando las cadenas laterales plegadas contra la cadena central (Figura 1.14). Este tipo de estructura se puede asimilar a la de un “rodillo rígido”. Análisis de difracción de rayos X indican que la goma se presenta como una sola hélice mientras que estudios quirópticos y de microscopía electrónica sugieren que se trata de una doble hélice o incluso de una superhélice de orden mayor.

Este tipo de estructura explica por un lado, la gran estabilidad frente al calor, la acción de ácidos y álcalis y al ataque enzimático que presenta este polisacárido. Las soluciones tienen una excelente estabilidad a 80°C, que se ve incrementada por la presencia de NaCl. Respecto a la influencia del pH, se ha observado que la goma no se ve afectada en el amplio rango entre pH 1 y pH 13. Distintas enzimas (celulasas, amilasas, pectinasas, hemicelulasas) no afectan a esta goma.

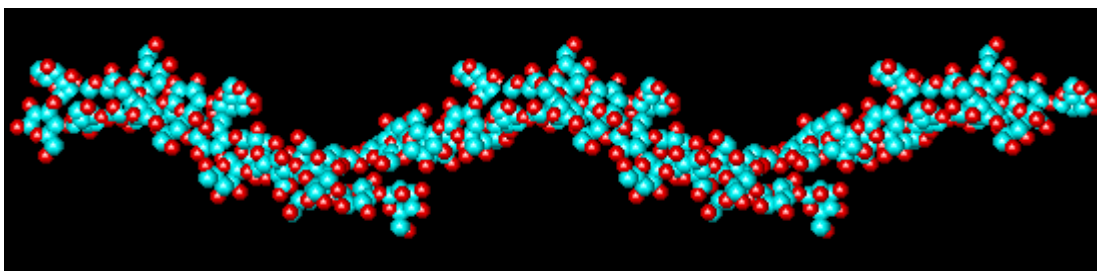


Figura 1.14 Estructura secundaria de la goma xántica

Fuente: www.esf.edu/chemistry/winter/xanthana.gif

Por otro lado y junto con el elevado peso molecular, la estructura permite entender los altos valores de viscosidad obtenidos en las soluciones de esta goma, aun a concentraciones relativamente bajas; soluciones de 1 % o mayores concentraciones de esta goma parecen geles cuando se encuentran en estado de reposo (Glicksman, 1982). Las soluciones son pseudoplásticas y presentan además un umbral de fluencia, lo que hace efectivo el uso de esta goma para estabilizar emulsiones evitando la coalescencia de las gotas lipídicas y suspensiones, evitando la decantación de las partículas. La asociación intermolecular, a través de enlaces no covalentes, entre las cadenas poliméricas rígidas da como resultado una red de “rodillos rígidos” enredados. Estos agregados débilmente unidos se romperían progresivamente al aplicar un cizallamiento, lo que explica la pseudoplasticidad del sistema. Esta misma estructura explica el umbral de fluencia. No obstante estas características reológicas, las soluciones de goma xántica se pueden verter y bombear con facilidad. El mismo comportamiento se observa aun en concentraciones menores (0,1-0,3 %) que son las usualmente aplicadas en la industria alimentaria.

Si bien la goma xántica por sí sola no gelifica, la combinación de ésta con goma garrofín produce geles cohesivos y viscoelásticos, como se explicará más adelante.

La goma xántica es usada actualmente como agente espesante en salsas, aderezos, sopas, flanes y postres y contribuye a la viscosidad en helados y

bebidas lácteas (Glicksman, 1982). Se utiliza según el CAA como espesante, estabilizante y emulsificante.

4.3 Goma Guar

Esta goma se obtiene del endosperma de la semilla de una planta anual perteneciente a la familia de las leguminosas, *Cyamopsis tetragonolobus*, cultivada originalmente en India y Pakistán.

Para su obtención se parte de las semillas que una vez limpias y desprovistas de cáscara y germen se someten a molienda. Se reduce así el endosperma a harina, que contiene aproximadamente 95 % de galactomanano. Usualmente se comercializa de esta manera pero para la obtención de gomas más puras se extrae de la semilla con agua caliente y luego se precipita con alcohol, se lava y se remueve el alcohol residual por prensado. Como última etapa, se seca, se muele y tamiza.

Estructuralmente está formada por un esqueleto de D-manosas, unidas por enlaces β 1→4 y una sustitución lateral de unidades de galactosa con enlace α 1→6, cada, aproximadamente dos residuos de manosa por lo que la relación manosa:galactosa es 2:1 (o menor). Por estas características estructurales se la considera un galactomanano (Figura 1.15).

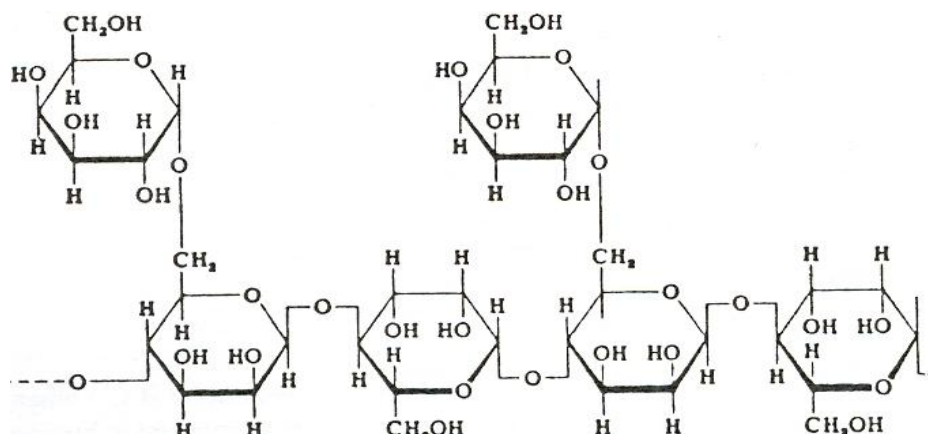


Figura 1.15 Estructura molecular de la Goma Guar.

Fuente: Glicksman (1982)

La molécula tiene una estructura rígida debido a las uniones β entre los monómeros de la cadena central de manosa (Glicksman 1992). Los sustituyentes de galactosa están distribuidos irregularmente en la larga cadena de manano, quedando definidas por lo tanto, zonas “lisas” (no sustituidas) y zonas “ramificadas” o “pilosas” (sustituidas).

Tiene una masa molecular de 220.000 Da. Una solución acuosa al 1% (p/v) de guar tiene una viscosidad de 5.500 cps a 25 °C. Las soluciones de goma guar de concentraciones iguales o mayores al 1 % son tixotrópicas, estables a 85°C y usualmente estables entre pH 3,5 y 9. Por otro lado, el pH influye sobre la capacidad de hidratación de la goma, siendo la máxima velocidad de hidratación a pH 8 y la mínima a pH 3,5. La goma guar en solución es susceptible al ataque de diversas enzimas microbianas.

Esta goma, por sus acentuada capacidad espesante está muy difundida como aditivo alimentario, como estabilizante, espesante y emulsificante según lo indica el CAA.

4.4 Goma Garrofín

También conocida como LBG por sus siglas en inglés (Locust Beam Gum), se obtiene a partir de la molienda del endosperma de la semilla del fruto de *Ceratonia siliqua*, árbol perteneciente a la familia de las leguminosas que crece en países mediterráneos como Italia, España, Grecia y California en el continente americano. Es un polisacárido de una masa molecular de aproximadamente 300.000 Da. La molécula es una cadena lineal de D-manosa con enlaces β 1 \rightarrow 4; cada 4 ó 5 unidades D-manosa hay una ramificación de una unidad de D-galactosa unida por enlace α 1 \rightarrow 6, por lo que la relación manosa:galactosa es de 4:1. Desde este punto de vista se trata de un galactomanano menos sustituido que la goma guar, de menor rigidez molecular (Figura 1.16).

Como en el caso de la goma guar, su estructura presenta zonas sustituidas y zonas no sustituidas. Si bien por sí sola no gelifica puede hacerlo con otras gomas ya que las zonas no sustituidas son capaces de hacerlo con las hélices de otros polisacáridos en solución como goma xántica y K-carragenanos.

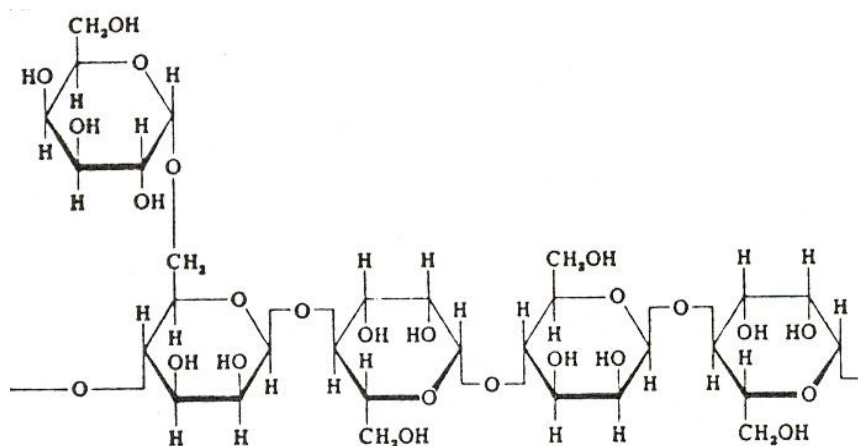


Figura 1.16 Estructura molecular de la goma garrofin.

Fuente: Glicksman (1982)

En el caso de la combinación con goma xántica, Schorsch y col. (1997) encontraron un marcado aumento de elasticidad a partir de 50% de concentración de goma xántica, con un máximo a 60% y luego un decrecimiento hasta 90%. La máxima fuerza de gel se logra mezclando cantidades iguales de ambos polímeros. En la Figura 1.17 se muestra el esquema del tipo de unión que estabiliza el gel mixto que forma con la goma xántica, entre las zonas lisas o no pilosas de la cadena de goma garrofín y la doble hélice de la goma xántica. Las zonas pilosas actúan como nexo entre las zonas de unión.

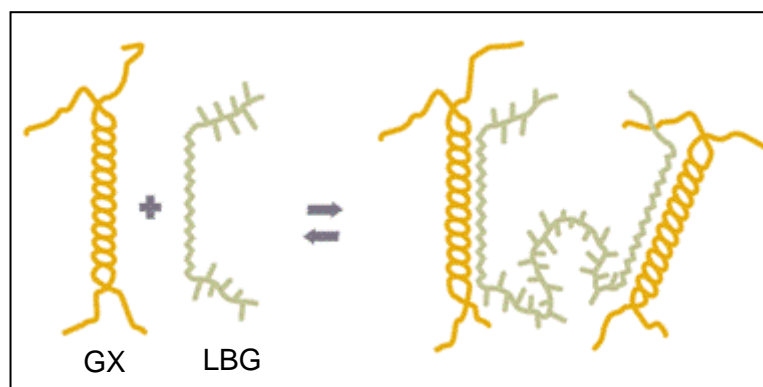


Figura 1.17 Zonas de unión en los geles de goma xántica (GX) y garrofín (LBG).

Según el CAA, la goma garrofín puede utilizarse como espesante y estabilizante. Entre otros usos se pueden mencionar: en helados como estabilizante, en productos lácteos fermentados para mejorar su textura, en harina para mejorar las propiedades ligantes de agua aumentando el rendimiento.

4.5 Pectina

Las pectinas constituyen alrededor del 30 % del peso seco de las paredes celulares primarias de los vegetales. Para su uso como aditivos alimentarios se realiza una extracción de frutos y otras partes de plantas comestibles, en las que juega un rol estructural. Como fuente son particularmente importantes los cítricos y manzanas.

La cadena principal de este polisacárido contiene de 200 a 100 unidades de ácido D- galacturónico unido por enlaces glicosídicos α 1→4 (Figura 1.18). Algunas de las unidades de ácido galacturónico en la molécula están esterificadas y se presentan como esteres metílicos. Los grupos restantes pueden estar total o parcialmente neutralizados como sales de amonio, potasio o sodio.

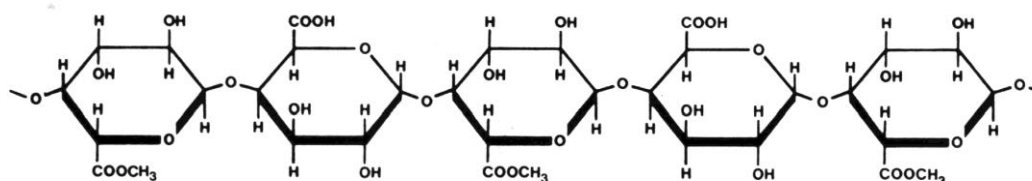


Figura 1.18 Estructura molecular de la cadena principal de pectina

Fuente: Glicksman, (1982).

Las pectinas de alto grado de esterificación o de alto metoxilo tienen un grado de esterificación de 50% o más mientras que las de bajo grado de esterificación o bajo metoxilo contienen un grado de esterificación menor al 50%. Las pectinas presentan además ramificaciones, conformadas por monosacáridos distintos del ácido galacturónico (Figura 1.19) lo que genera zonas lisas y zonas pilosas. Dentro de la cadena de galacturonano principal se encuentran insertas unidades de ramnosa. Estas inserciones estarían agrupadas y coinciden con las ramificaciones que dan origen a las denominadas zonas “pilosas”.

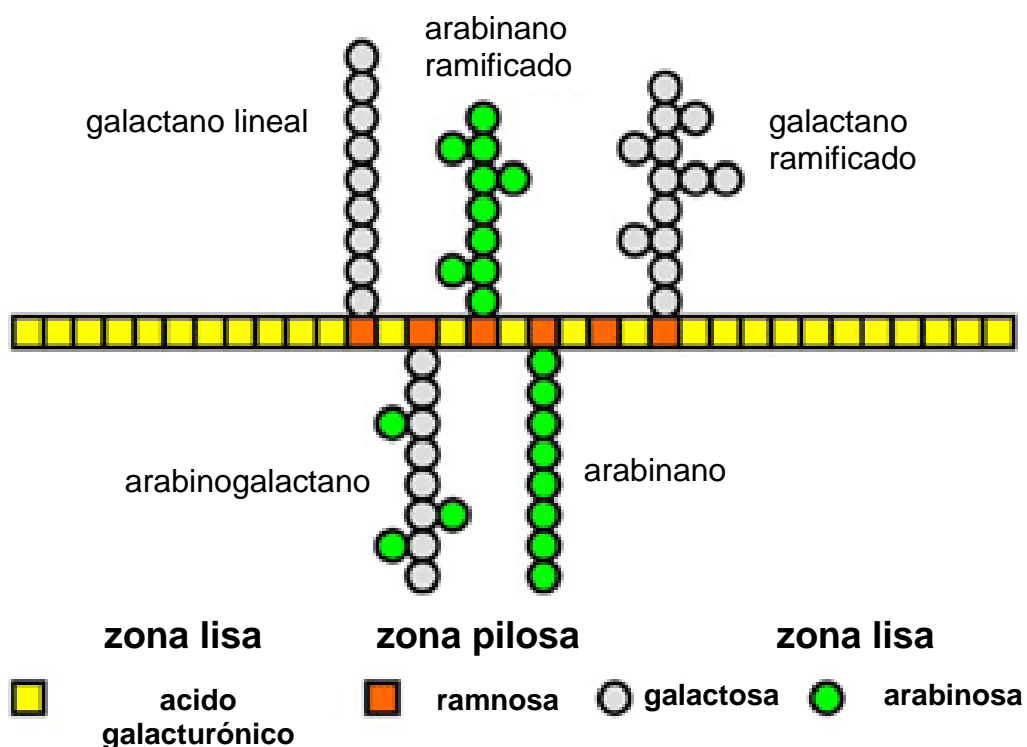


Figura 1.19 Esquema de la estructura de las zonas lisas y pilosas de la pectina.
Fuente: Gunning y col. (2008).

Entre zonas “pilosas” habría zonas lisas conformadas por segmentos de homogalacturonano. Las zonas “lisas” forman una hélice, cuya unidad repetitiva son tres unidades de ácido galacturónico, esta conformación se encuentra estabilizada por uniones puente de hidrógeno generándose una estructura tipo rodillo rígido. Sin embargo, la estructura rígida es interrumpida por las zonas “pilosas” donde la ramnosa ocasiona dobleces en la cadena principal (Figura 1.20). La presencia de estos dobleces es lo que permite que en ciertas condiciones la pectina pueda gelificar.

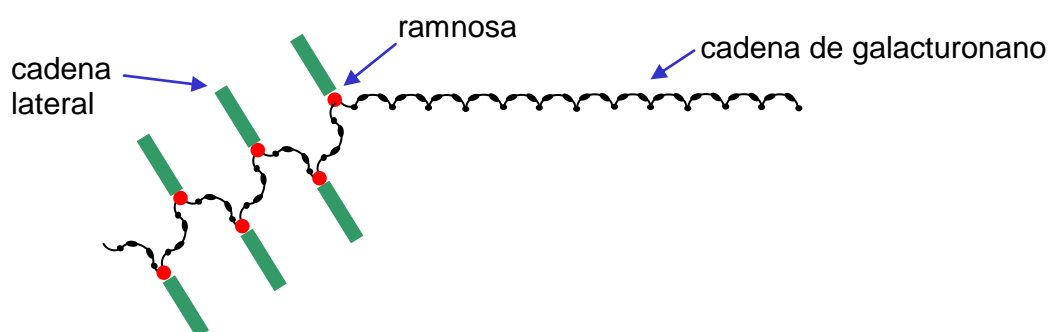


Figura 1.20 Modelo de estructura de pectina de De Vries y col. (1982, 1983).

Ambos tipos de pectinas (de alto y de bajo metoxilo) tienen propiedades gelificantes pero lo hacen en distintas condiciones, las de alto metoxilo requieren pH ácidos mientras que las de bajo metoxilo gelifican en presencia de ión Ca^{++} , en un modelo que se conoce como de “caja de huevos” (Figura 1.21)

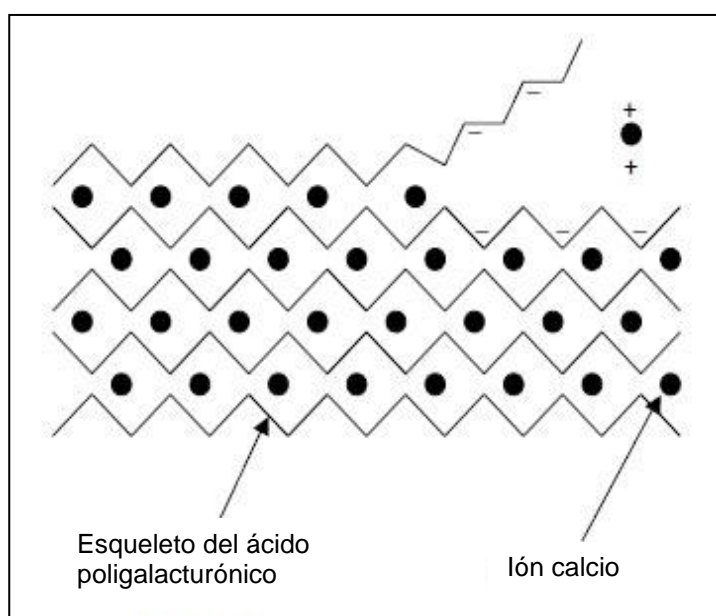


Figura 1.21 Modelo de gelación de pectina de bajo metoxilo en presencia de calcio.

La masa molecular de las pectinas varía de 50.000 a 150.000 Da. En solución presenta viscosidad relativamente baja comparada con otras gomas, siendo casi newtonianas las soluciones diluidas pero cambiando a comportamiento pseudoplástico a medida que aumenta la concentración. El agregado de NaCl conduce a una disminución de la viscosidad ya que contrarresta la repulsión entre cadenas ocasionada por los grupos carboxilo y esto disminuye el volumen hidrodinámico. A diferencia de otros hidrocoloides, la pectina muestra una gran estabilidad a pHs ácidos.

En la industria se las utiliza para dar textura a mermeladas, jaleas, preparados de frutas; en bebidas frutales y salsas para estabilizar la suspensión de partículas frutales y en yogures, para mejorar la textura de los mismos. Según el CAA está permitido utilizarlo como gelificante, espesante y estabilizante (CAA 2010).

En la Tabla 1.12, se muestran los aspectos estructurales principales de cada hidrocoloide utilizado en el presente trabajo en forma comparativa.

Tabla 1.2 Propiedades físicas y químicas de los hidrocoloides utilizados

Hidrocoloides	Estructura química	Estructura molecular	Carga
Goma Xantica (GX)	Cadena principal de β -D-glucosa con cadenas laterales de trisacáridos	Rodillo rígido	Aniónico
Goma Guar (GG)	Cadena principal de β -D-manosa con una galactosa unida a la cadena lateral (galactosa:manosa 2:1)	Rodillo rígido	No iónico
Goma Garrofin (LBG)	Cadena principal de β -D-manosa con una galactosa unida a la cadena lateral (galactosa:manosa 4:1)	Mas flexible que goma guar	No iónico
Pectina de Alto Metoxilo (PE)	Cadena α -D-galacturónico con un grado de esterificación cercano al 50% y una cadena lateral de azúcar neutra	Flexible	Aniónico

Hipótesis

Los hidrocoloides por sus características estructurales pueden ser potenciales mejoradores de la masa panaria. Su eficacia dependerá de la estructura y de las interacciones que puedan establecer con otros componentes de la masa, particularmente el gluten. Por ser macromoléculas altamente hidrofílicas y de elevado peso molecular afectarán las características de la masa, principalmente la absorción de agua y el comportamiento reológico. El grado de mejora sobre el producto final dependerá del nivel y tipo de hidrocoloide utilizado.

Objetivo general

Estudiar el mecanismo de acción de distintos hidrocoloides como aditivos mejoradores en la panificación.

Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de los hidrocoloides sobre la absorción de agua de la harina de trigo y el comportamiento reológico de la masa de harina de trigo.
- Estudiar el efecto de los hidrocoloides sobre la microestructura de la masa mediante diferentes técnicas.
- Estudiar la interacción de los hidrocoloides con la proteína y el almidón de la masa de trigo.
- Evaluar el efecto de los hidrocoloides en la panificación y la conservación de los panes.

Desarrollo de la tesis

En los siguientes capítulos se abordarán los siguientes aspectos:

Capítulo 2

Efecto de los hidrocoloides sobre la capacidad de absorción de agua y la reología de la masa panaria

Capítulo 3

Interacción de los hidrocoloides con los principales componentes de la masa

Capítulo 4

Efecto de los hidrocoloides sobre el proceso de panificación y atributos de calidad de los panes

Capítulo 5

Conclusiones generales

Bibliografía



Capítulo 2

Efecto de los hidrocoloides sobre la capacidad de absorción de agua y la reología de la masa panaria

2.1 Introducción

2.1.1 Capacidad de absorción de agua

La absorción de agua de una harina es un factor importante en la panificación ya que ella contribuirá a la calidad del producto, su vida útil y el rendimiento del proceso. Asimismo, la cantidad de agua influye en la reología de masa ya que una restricción de agua da como resultado masas demasiado fuertes, difíciles de manipular e incapaces de producir un volumen de fermentación adecuado.

Son varios los factores que inciden en este parámetro, entre ellos: grado de molienda, calidad y cantidad de gluten, porcentaje de almidón dañado, presencia de fibra (principalmente pentosanós) (Stauffer, 1998).

Varios ensayos comúnmente utilizados en harina están relacionados con la capacidad de absorción de agua de uno o más componentes de la misma. La absorción de agua farinográfica es el parámetro más usado para determinar la cantidad óptima de agua necesaria a emplear en la elaboración del pan. Este parámetro está relacionado principalmente con el agua involucrada en el desarrollo de la red de gluten. Existen otros índices utilizados para evaluar la aptitud de la harina. El Índice de Sedimentación en dodecil sulfato de sodio (IS-SDS), originalmente desarrollado para *Triticum durum* (Dick y Quick, 1983), mide la altura del sedimento obtenido luego de mezclar la harina con una solución de SDS y dejar en reposo. Esta altura está relacionada con la capacidad de hidratación y expansión de las gluteninas, ya que el flóculo de proteínas contribuye sustancialmente al volumen de sedimentación (Eckert y col, 1993, Weegels y col. 1996); altos valores de este índice están asociados con un gluten fuerte y por lo tanto, con una calidad panadera superior de la harina (Dick y Quick 1983). Otro ensayo habitual para harinas es el de capacidad de retención de una solución de sacarosa (SRC) (Método 56-11, AACC), específicamente desarrollado para evaluar la calidad de trigos blandos (Slade y Levine, 1994). Los resultados de este método están más asociados con la absorción de agua de componentes no proteicos de la harina,

principalmente los pentosanos (fibra) y es utilizado comúnmente para evaluar la aptitud de una harina en la elaboración de galletitas. Una excesiva retención de agua lleva a un desempeño pobre de la harina y a un incremento en el tiempo de cocción (Guttieri y col. 2001).

Además de los ensayos de absorción mencionados, específicos para harinas, existen otros de aplicación más general que pueden ser valiosos en la evaluación de las propiedades de hidratación. Entre ellos, la capacidad de absorción o imbibición de agua (water imbibing capacity, WIC), que se ha utilizado tradicionalmente para determinar la absorción en aislados o concentrados proteicos (Remondetto y col. 2001, Jovanovich y col. 2003) y ha sido un método poco explorado en harinas.

2.1.2 Propiedades reológicas

La masa de harina de trigo es un sistema complejo desde el punto de vista de sus propiedades reológicas, que se pueden determinar por diferentes métodos. Las determinaciones reológicas se pueden clasificar según el esquema de la Figura 2.1 (Bourne, 1982).

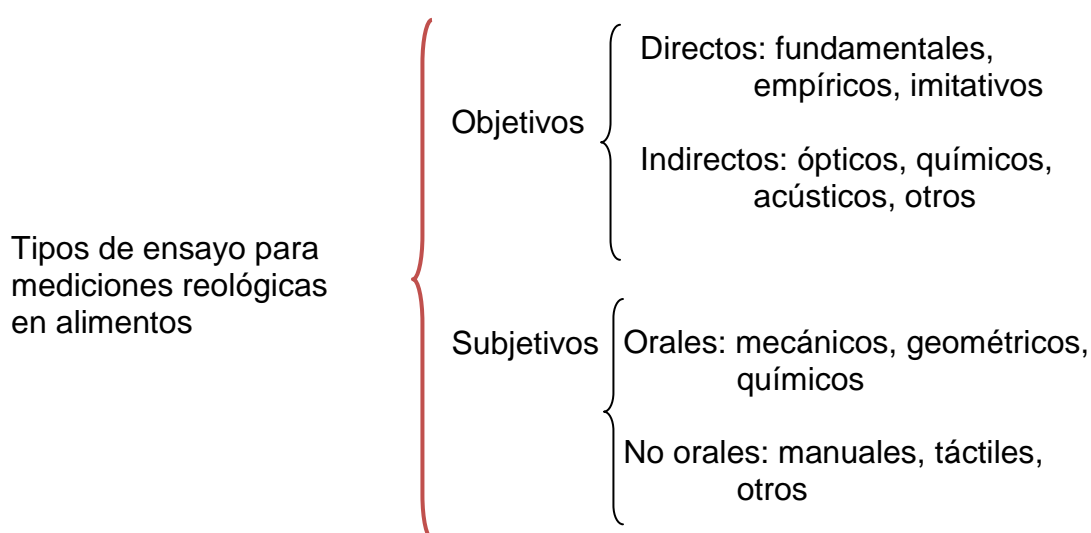


Figura 2.1 Clasificación de ensayos reológicos

Las mediciones objetivas directas pueden ser fundamentales, empíricas o imitativas. Las primeras miden propiedades reológicas bien definidas, son expresables en términos de unidades básicas (Kg, m, s) y los parámetros hallados no dependen del método usado. Las mediciones fundamentales son muchas veces impracticables en sistemas alimentarios reales o bien proporcionan información que no es fácil de analizar ya que fueron diseñadas originalmente para la caracterización de materiales de construcción y no siempre pueden reflejar lo que ocurre en otros sistemas o condiciones, por ejemplo en la boca cuando un alimento es masticado (Bourne, 1982). Ejemplo de este tipo de mediciones son las efectuadas con viscosímetros rotacionales y los ensayos dinámicos con reómetros oscilatorios.

Las determinaciones empíricas miden parámetros que no están tan bien definidos como aquellos obtenidos a partir de las fundamentales pero que resultan útiles para describir la calidad textural. Así, permiten reunir información que aunque no sea comparable entre las distintas metodologías permite obtener resultados en forma más rápida y simple. Una desventaja de estos métodos es que los resultados son específicos de un instrumento dado.

Los ensayos imitativos emulan las condiciones a las cuales son sometidos los sistemas materiales en la práctica. Se pueden considerar como ensayos empíricos. Ejemplos de mediciones imitativas empíricas en masas son las efectuadas con el farinógrafo y el extensógrafo de Brabender y con el alveógrafo de Chopin. El farinógrafo reproduce en pequeña escala el amasado de una harina con agua, registrándose la fuerza necesaria en unidades farinográficas (UF). En el extensógrafo se somete a una masa a un estiramiento hasta su ruptura y se registra la fuerza en función de la distancia. En el alveógrafo, se deforma un disco de masa por insuflado de aire, imitando la dilatación que sufrirá la masa durante la fermentación y la etapa inicial del horneado.

También se consideran dentro de la categoría de ensayos imitativos los realizados con los texturómetros, que permiten registrar la fuerza necesaria para someter a un material a cierta deformación. Se denomina textura a la

propiedad que tienen las superficies externas de los objetos, así como las sensaciones que causan, que son captadas por el sentido del tacto. El análisis de perfil de textura (TPA) de un alimento se obtiene a partir de la aplicación de dos ciclos consecutivos de compresión sobre una muestra imitando el efecto de la masticación sobre el alimento. De las curvas se obtienen parámetros que se han podido relacionar con los sensoriales (dureza, consistencia, adhesividad, cohesividad, elasticidad, entre otros).

La masa de harina de trigo presenta propiedades viscoelásticas, es decir exhibe simultáneamente las propiedades viscosas propias de un líquido y las elásticas características de un sólido. El modelo viscoelástico más sencillo puede representarse por medio de la combinación de los elementos que representan, en reología, el comportamiento elástico (resorte) y el viscoso (caldera llena de líquido con un émbolo que se mueve en sentido ascendente/descendente, llamado también amortiguador).

Los modelos permiten describir el comportamiento en función de parámetros y predecir el mismo en otras condiciones. La combinación de elementos elásticos y viscosos permite acercarse a la descripción del comportamiento de sistemas reales. Si ambos elementos están acoplados en serie, representan un líquido viscoelástico (modelo de Maxwell) mientras que conectados en paralelo, representan un sólido viscoelástico (modelo de Kelvin-Voigt). A su vez, si se acoplan en serie ambos modelos se obtiene el de Burgers, que representa un

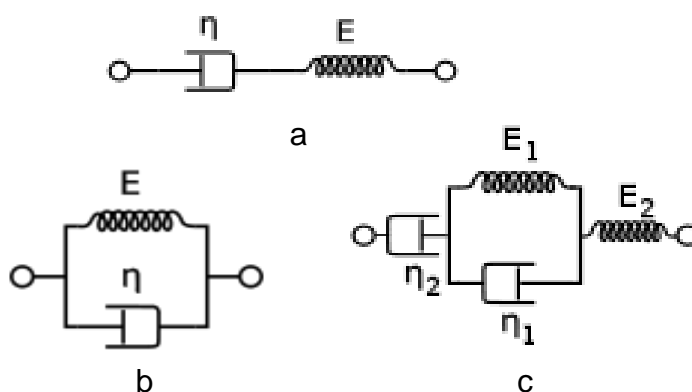


Figura 2.2 Modelos de Maxwell (a), Kelvin-Voigt (b) y Burgers (c) donde E representa el elemento elástico y η el elemento viscoso.

comportamiento mucho más cercano al de diversos sistemas alimentarios reales (Figura 2.2).

Los sistemas cuyo comportamiento se puede describir por el modelo de Burgers se deformarán paulatinamente cuando se aplique una fuerza y se recuperarán parcialmente y en forma retardada cuando la fuerza cese (Figura 2.3.A). La masa de harina de trigo presenta una gráfica de deformación-tiempo (Figura 2.3 B) similar a la del modelo de Burgers donde se observa una deformación paulatina (de a hasta b) y una recuperación retardada (de b a c)

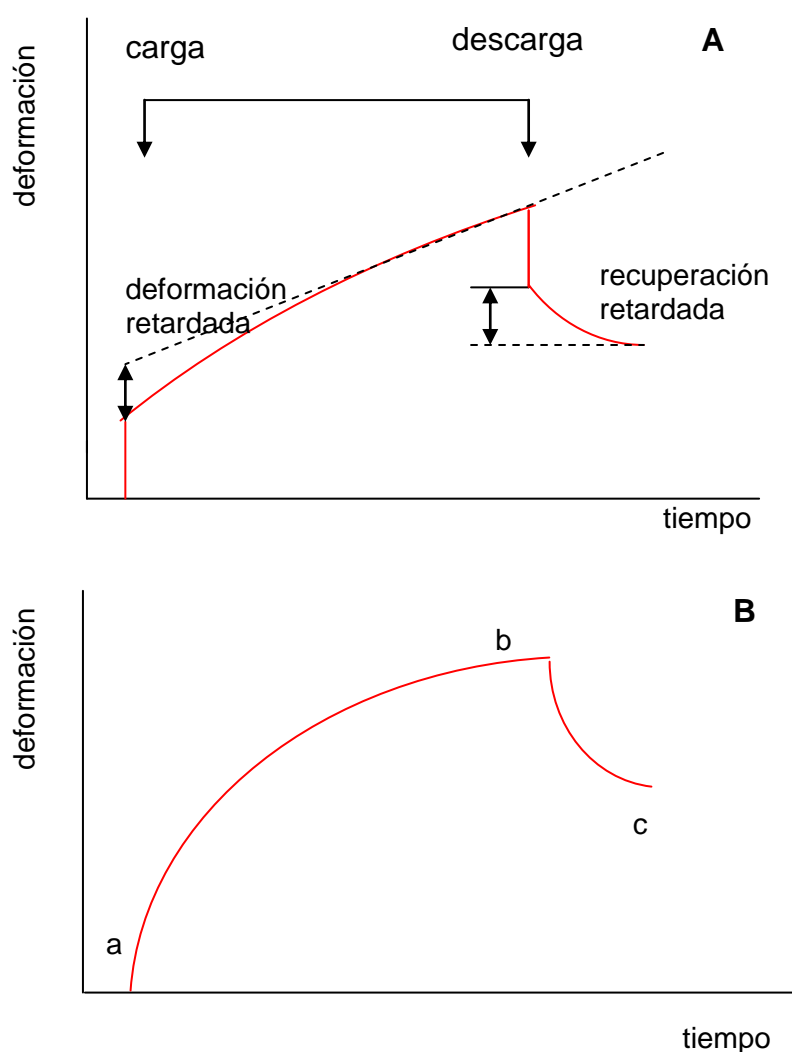


Figura 2.3 Gráfico de deformación – tiempo (carga-descarga) para el modelo de Burgers (A) y típico de harina de trigo (B) (adaptado de Muller, 1973).

2.1.3 Microestructura por microscopia

Las características reológicas están vinculadas a la microestructura del sistema. Una de las herramientas más poderosas para la caracterización microestructural es la microscopía, en sus diversas variantes: óptica, de barrido electrónico, confocal, entre otras. La microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) se basa en la utilización de un haz de electrones en lugar de un haz de luz y de electroimanes en lugar de lentes. La preparación de las muestras se hace recubriéndolas de una fina capa de metal como el oro para otorgarle propiedades conductoras. Posteriormente se barre con electrones acelerados. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de video o una imagen digital. Su resolución está entre 4 y 20 nm, dependiendo del microscopio.

Los objetivos del presente capítulo son: a) evaluar el efecto del tipo y concentración de distintos hidrocoloides sobre la absorción de agua de mezclas harina-hidrocoloide a través de diferentes metodologías; b) analizar la influencia de la adición de hidrocoloides y el contenido de agua sobre la reología de las masas.

2.2 Materiales

2.2.1 Harina

Para estos ensayos se utilizó harina comercial tipo 000 (CAA) provista por Molino Campodónico Ltda. (La Plata, Argentina), cuyas características de composición y datos alveográficos provistos por el molino se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Características de la harina utilizada

Parámetros de la harina		
Composición	Proteínas (%)	13,1
	Humedad (%)	14,9
	Cenizas (%)	0,7
	Gluten húmedo (%)	26,9
	Gluten seco (%)	9,7
Alveograma	P –altura del alveograma (mm)	101
	L – base del alveograma (mm)	89
	P/L	1,1
	Trabajo de deformación W ($J \times 10^4$)	323

Datos suministrados por Molino Campodónico Ltda.

2.2.2 Hidrocoloides

Se utilizaron los siguientes hidrocoloides comerciales provistos por Saporiti S.A (Buenos Aires, Argentina): goma guar (GG), goma garrofín (LBG), pectina de alto metoxilo (PE), goma xántica (GX). Se utilizó además una mezcla de garrofín y xántica (LBG+GX) en proporciones iguales de ambos hidrocoloides (1:1), agregándose en el mismo rango de concentración que las demás gomas. Según especificaciones del proveedor, estos aditivos responden a la normativa vigente (art. 1398, CAA, 2010).

2.2.3 Mezcla harina-hidrocoloide

Se utilizó un diseño aleatorizado, donde se varió la concentración de hidrocoloide. Las concentraciones empleadas de aditivo fueron 0,25; 0,5; 1 y 1,5% (base 100 g de harina). Como control se utilizó harina sin agregado de aditivo (0%).

Para los diferentes tipos de ensayo, la preparación del sistema varió según:

Ensayos de absorción de agua: se mezclaron, en seco, la harina y los hidrocoloides en los diferentes niveles de concentración. Los ensayos se hicieron sobre mezclas con y sin NaCl. Las mezclas se mantuvieron en recipientes herméticos hasta el momento del ensayo.

Ensayos reológicos: se premezclaron en una amasadora la harina, los hidrocoloides y la sal (2 g cada 100 g de harina) y luego se adicionó agua en la cantidad correspondiente según el ensayo fuera con agua adaptada según absorción farinografica o agua constante.

2.3 Metodologías

2.3.1 Viscosidad aparente de sistemas hidrocoloide-agua

La viscosidad aparente de sistemas modelo hidrocoloide agua en una concentración de 10% (p/p) se midió a 10 rpm con un viscosímetro rotacional Brookfield (Middleboro, EEUU) a temperatura ambiente.

2.3.2 Absorción de agua

2.3.2.1 Absorción de agua farinográfica (A)

La determinación del porcentaje de agua farinográfica de las mezclas se realizó con un farinógrafo Brabender de 50 g de capacidad (Duisburg, Alemania).

Se determinó el porcentaje de absorción de agua (A) de cada mezcla harina-hidrocoloide, con y sin el agregado de NaCl (2 % base 100g de harina), según el Método 54-21, AACC 1995. La tolerancia para el error fue de 1% (Norma IRAM 15855, 2000). Este parámetro se define como el volumen de agua necesario para obtener en el farinógrafo una masa con una consistencia máxima de 500 Unidades Farinográficas o Brabender, expresado en ml/100 g de harina.

2.3.2.2 Capacidad de absorción de agua (WIC)

Este método permite evaluar la absorción espontánea de agua de un preparado en forma de polvo seco. Es un método normalmente aplicado a sistemas proteicos (Sorgentini, 1991; Jovanovich, 2003).

La capacidad de absorción de agua (water imbibing capacity, WIC) se determinó utilizando un equipo de Baumann (1967). El dispositivo consiste en una pipeta de 10 ml graduada cada 0,01 ml (A) conectada por un tubo flexible (B) de aproximadamente 30 cm de longitud a un embudo de acrílico de placa cribada (C) (Figura 2.4).

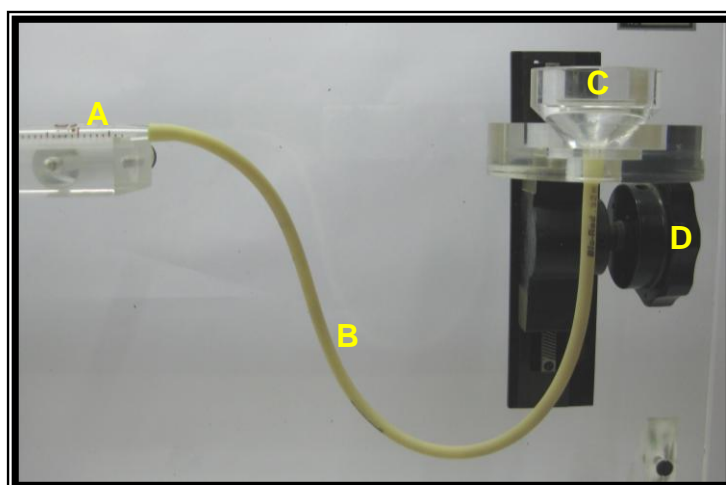


Figura 2.4 Equipo utilizado para la determinación de absorción de agua. A: pipeta; B: tubo flexible; C: embudo con papel de filtro; D: tornillo de ajuste de altura.

Para calibrar el sistema se agregó agua destilada desde el embudo hasta que el menisco superó el cero de la escala de la pipeta. Se colocó un papel de filtro dentro del embudo y con un material absorbente, se enrasó la pipeta en cero y se tapó el embudo para evitar pérdidas por evaporación. Luego de la puesta en cero del volumen con agua destilada, se dejó estabilizar el sistema durante 10 minutos. Para realizar las mediciones se colocó sobre el papel de filtro una cantidad exactamente pesada (aproximadamente de 50 mg) de mezcla harina-hidrocoloide, pasada a través de un tamiz de modo de obtener una capa uniforme. Simultáneamente se comenzó a registrar el volumen de agua absorbido por la muestra hasta alcanzar un valor constante. Las mediciones se hicieron por duplicado. Con el valor de la máxima cantidad de agua absorbida se calculó el valor de WIC según la ecuación 2.1.

$$WIC = \frac{\text{ml totales de agua absorbida}}{\text{mg de mezcla}} \quad (2.1)$$

2.3.2.3 Índice de sedimentación en dodecil sulfato de sodio (IS-SDS)

La determinación del índice de sedimentación (IS-SDS) se realizó mediante el método Dick y Quick (1989) modificado por Mansur y col. (1990).

Este método permite evaluar la capacidad de hidratación de proteínas de gluten, a través de la altura del sedimento obtenido. Esta altura se relaciona con la fuerza del gluten.

Se utilizaron las siguientes soluciones:

- a) SDS 2% p/v: 20 gramos de dodecil sulfato de sodio en 1000 ml de agua más una punta de espátula de colorante azul de bromofenol.
- b) Solución de ácido láctico 1:8 v/v.
- c) Solución stock: 1 parte de solución de ácido láctico y 48 partes de solución SDS + azul de bromofenol, preparada en el momento.

Se colocó 1 gramo de cada muestra en un tubo de ensayo y se agregaron 4 ml de agua destilada. Se agitó cada tubo durante 20 segundos, luego se dejó reposar 5 minutos y se volvió a agitar por 10 segundos. Cada muestra se dejó reposar por otros 5 minutos. Se agregaron 12 ml de la solución stock. Se tapó cada tubo con un tapón de goma y se agitó por inversión 16 veces en 40 segundos. Después de dejar reposar por 2 minutos se invirtió cada tubo nuevamente 16 veces en 40 segundos. La altura del sedimento se midió en mm. Se realizaron triplicados por cada muestra.

2.3.2.4 Capacidad de retención de solvente sacarosa (SRC sacarosa)

Esta determinación permite evaluar la capacidad de una harina para retener una solución de sacarosa (denominada “solvente sacarosa”). Se realizó según el método 56-11 de AACC (2000).

Se pesaron 5 g de cada mezcla de harina-hidrocoloide en tubos de centrífuga con tapa, previamente tarados. Se agregaron $25 \pm 0,05$ g de solución de sacarosa 50% (p/p) y se agitaron vigorosamente por 5 segundos. Los tubos se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente, agitando cada 5 minutos e inmediatamente se centrifugaron a 1000 xg por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó drenar los tubos durante 10 minutos boca abajo colocándolos sobre papel absorbente con una inclinación de aproximadamente 45° . Se pesó el contenido de los mismos y se determinó el porcentaje de SRC sacarosa con la ecuación 2.2 estandarizando la expresión de resultados respecto a un contenido de humedad de la harina de 14%. El ensayo se realizó por duplicado.

$$\%SRC = \left[\left(\frac{Mh}{M} \times \frac{86}{(100 - \%H)} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (2.2)$$

Donde:

Mh: gramos de muestra hidratada

M : gramos de muestra seca

$\%H$: porcentaje de humedad de la muestra

86: cantidad de sólidos de una harina con 14% de humedad

2.3.3 Ensayos reológicos sobre masa

2.3.3.1 Parámetros farinográficos

Con un farinógrafo Brabender modelo 50 g (Duisburg, Alemania) se obtuvieron los farinogramas para cada mezcla con y sin agregado de NaCl según el procedimiento descrito en el método AACC 54-21 (2004). Los parámetros que se determinan en un farinograma son (Figura 2.5):

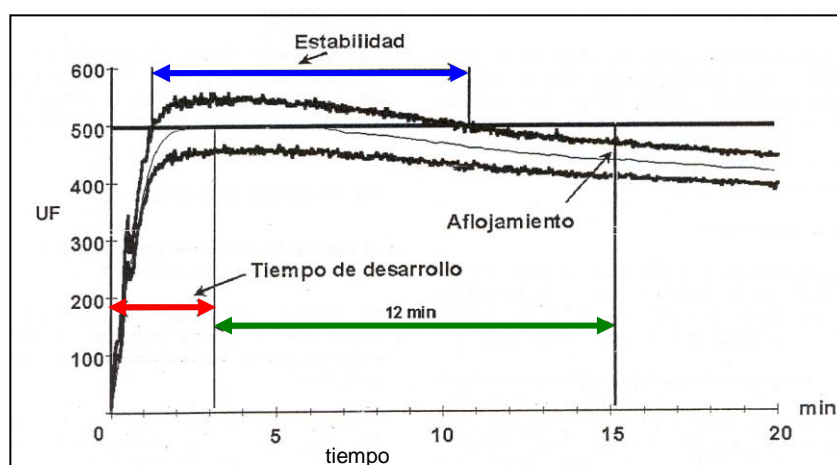


Figura 2.5 Farinograma de una harina. Adaptado de Norma IRAM 15855 (2000).

Absorción de agua (A): explicada en el ítem 2.3.2.1.

Tiempo de desarrollo (t_d): tiempo que transcurre desde el comienzo del agregado de agua hasta el punto máximo de la curva. Se expresa en minutos.

Estabilidad farinografica (t_e): tiempo transcurrido entre el punto en que la línea superior de la curva alcanza 500 UF (unidades farinograficas) y el momento donde vuelve a contactar la línea de 500 UF. Se expresa en minutos.

Aflojamiento o grado de ablandamiento (Afl): diferencia (en UF) entre el centro de la curva en el punto en que comienza la declinación y el centro de la curva 12 minutos después de éste.

2.3.3.2 Ensayos alveográficos

Los ensayos alveográficos se realizaron en un alveógrafo de Chopin (Francia). Las masas fueron preparadas con la cantidad de agua indicada por el método a partir de la humedad de la harina o mezcla harina-hidrocoloide. De las curvas obtenidas (Figura 2.6) se pueden calcular los siguientes parámetros:

P: tenacidad (máxima presión alcanzada al soplar la muestra de masa hasta su ruptura) Se expresa en (mm).

L: extensibilidad (longitud de la curva). Se expresa en (mm).

W: trabajo de deformación alveográfico, obtenido a partir del área de la curva. Se expresa en ($J \times 10^4$).

P/L: relación de configuración de la curva.

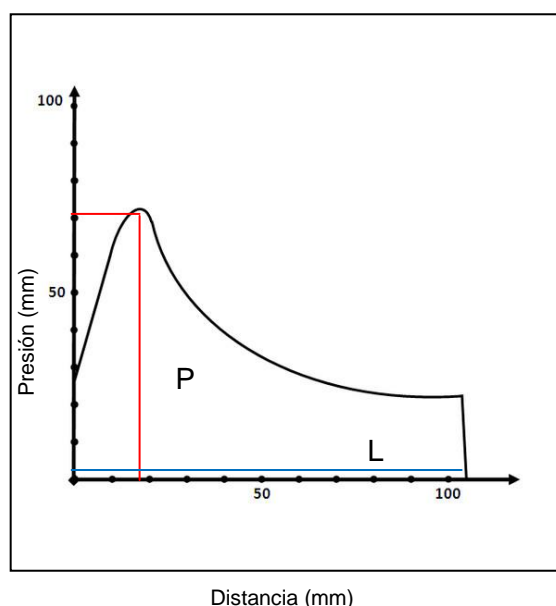


Figura 2.6 Alveograma típico donde se muestran los parámetros P y L

2.3.3.3 Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Se prepararon masas según la siguiente formulación: 100g harina; 2 g NaCl, 0,25; 0,5; 1 y 1,5% hidrocoloide (base 100 g harina) y agua en cantidad suficiente según dos condiciones de hidratación diferentes:

CONDICION 1 con nivel constante de agua en todas las muestras, correspondiente a la absorción farinografica de la harina sin el agregado de hidrocoloide (control).

CONDICION 2 con el contenido de agua adaptada según la absorción farinográfica obtenida para cada mezcla harina-hidrocoloide.

Para la preparación de la masa se utilizó una amasadora marca Arno BPA de 5 velocidades, capacidad 1.5 l (Brasil). Las cantidades utilizadas fueron: harina, 300g; sal comercial, 6g; cantidad de agua según la absorción farinografica y los hidrocoloides 0,75 g; 1,5 g; 3 g y 4,5 g correspondiente a 0,25; 0,5; 1 y 1,5% en base a 100g de harina. Como primer paso se premezclaron los ingredientes secos y luego se agregó agua según las dos condiciones de hidratación establecidas. Para comparar el efecto de los hidrocoloides, se fijó un tiempo de amasado constante para todas las masas, de 9 minutos. Este tiempo fue el necesario para obtener una consistencia óptima en la masa control (masa sin hidrocoloide) utilizando las cantidades y la amasadora mencionadas, resultando inferior al obtenido con el farinógrafo (tiempo de desarrollo). En el primer minuto se agregó el agua y se mezclaron los ingredientes y en los 8 minutos restantes se completó el amasado. La temperatura final de la masa fue de 23-25 °C. Las masas fueron cubiertas con film para evitar la deshidratación y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego las masas fueron laminadas doce veces para mejorar el desarrollo del gluten y se dejaron descansar 10 minutos a temperatura ambiente antes de obtener las muestras.

Para los ensayos de textura se utilizó el procedimiento descrito por Ponzio y col. (2008). Se extendió la masa hasta un espesor de 1 cm y se obtuvieron 30 piezas cilíndricas de 2 cm de diámetro con corta pasta metálico. El perfil de

textura de la masa fue obtenido usando un equipo TA.XT2i Texture Analyzer (STABLE MICRO SYSTEMS, Surrey, Reino Unido) con un software Texture Expert para Windows, versión 1.2.

La masa fue sometida a dos ciclos de compresión de 70 % de la altura original con una sonda cilíndrica de sección plana, de 7,5 cm de diámetro.

Las curvas de fuerza en función del tiempo fueron obtenidas a una velocidad de desplazamiento de la sonda de 0,5 mm/s. Se determinaron los siguientes parámetros:

Dureza (N): fuerza máxima registrada durante el primer ciclo de compresión.

Adhesividad (Ns): área por debajo de cero obtenida durante el primer ciclo.

Cohesividad (adimensional): cociente entre el área sobre cero del segundo ciclo y el área sobre cero del primer ciclo.

Elasticidad (adimensional): diferencia entre el tiempo correspondiente a la fuerza máxima registrada en el segundo ciclo y el tiempo por la velocidad de desplazamiento (mm/s).

En la Figura 2.7 se observa una curva típica de masa, donde se pueden diferenciar las áreas para cada ciclo de compresión.

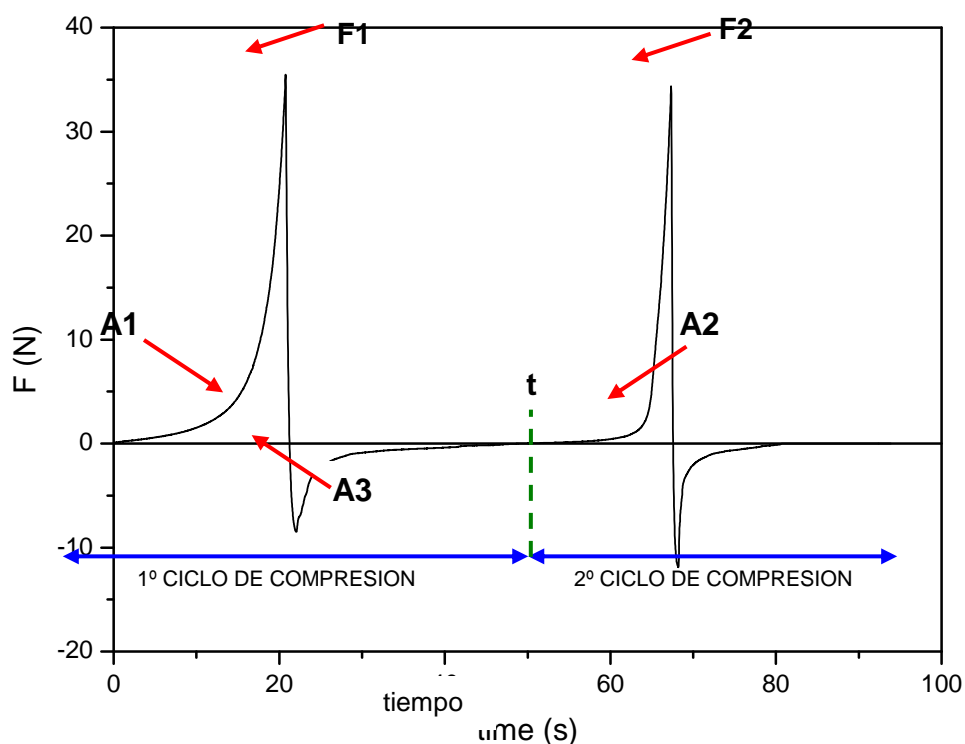


Figura 2.7 Ensayo de TPA. (Ensayo de dos ciclos de compresión).

Dureza = $F1$. Fuerza máxima en 1^{er} ciclo; Cohesividad = $\text{Área}_2 / \text{Área}_1$; Adhesividad = Área_3 ; Elasticidad = $(\text{Tiempo correspondiente a } F2 - \text{Tiempo } t) \times \text{velocidad de desplazamiento (mm/s)}$.

2.3.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para el acondicionamiento de las muestras, pequeñas porciones de masas (preparadas bajo CONDICION 1 y CONDICION 2) fueron inmersas en una solución acuosa de glutaraldehído al 2,5% para su fijación y luego lavadas con buffer fosfato 0,5 M antes del proceso de deshidratación. Las muestras fueron deshidratadas en una serie de diluciones de acetona al 25%, 50%, 75% y tres veces con acetona al 100% para asegurar una deshidratación completa. Las masas fueron desecadas por punto crítico con CO_2 fluido. Luego se cubrieron

con una película de oro con un metalizador Sputter Coater (Pelco, Redding, USA). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido electrónico JEOL JSM 35 CF (Tokyo, Japón) a 5 kV (ensayos realizados en CRIBABB Bahía Blanca).

2.3.5 Análisis estadístico

Los resultados de las distintas variables estudiadas en este capítulo se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). El test de Tukey se usó como método de comparación de medias a un nivel de significación del 0,5% ($P < 0,05$). Para este análisis se utilizó el software Systat 10.2 (Systat Inc. 2002, EE.UU). El número de ensayos se indicó en cada técnica respectiva.

El análisis de componentes principales (ACP) se utilizó como herramienta para detectar posibles agrupamientos o dispersiones de las variables analizadas. Esta herramienta estadística permite el análisis complejo de un conjunto de variables mediante la obtención de un número reducido de funciones a partir de ellas, denominándose dichas funciones “componentes principales” (CP). Estos componentes se obtienen mediante una transformación matemática de la matriz de correlaciones de las variables en una matriz que permita establecer combinaciones lineales. Esta situación se ejemplifica de la siguiente manera, mediante una matriz factorial:

variable	CP ₁	CP ₂	...	CP _n
X ₁	B ₁₁	B ₂₁	...	B _{n1}
X ₂	B ₁₂	B ₂₂	...	B _{n2}
...	
X _n	B _{1n}	B _{2n}	...	B _{nn}

De este modo, los componentes principales o factores quedan expresados como una combinación lineal de las variables originales con las ponderaciones proporcionales a los pesos de los distintos componentes, según se expresa en la ecuación 2.3:

$$PC_m = \sum \left[\left(\frac{B_{ij}}{l_i} \right) X_j \right] \quad (2.3)$$

Donde PC_m es componente principal y B_{ij} es el peso de la j -ésima variable en el i -ésimo componente, l_i es el autovalor asociado al componente i -ésimo y X_j es la j -ésima variable observada.

La carga o peso factorial indica el peso o influencia que tiene cada variable en un dado factor o componente. Lo ideal es que cada variable tenga una carga alta en un componente o factor y baja en los demás, pudiéndose interpretar dicha carga como un índice de correlación entre el factor y una dada variable. Los valores asumidos por la carga pueden abarcar de -1 a 1. Las cargas cercanas a -1 o 1 indican una alta correlación entre el componente y la variable. Las cargas cercanas a 0 indican poca influencia de esa variable en el factor. El autovalor o valor propio (eigenvalue) es la suma de los cuadrados de las cargas de cualquier columna de la matriz factorial. Indica la cantidad total de varianza que explica ese componente para las variables consideradas como grupo. Como las cargas factoriales pueden tener como valor máximo uno, el valor máximo que puede alcanzar el autovalor es igual al número de variables. La comunalidad es la proporción de la varianza explicada por los factores comunes en una variable. Es la suma de los pesos factoriales al cuadrado en cada variable.

La variabilidad queda referida a la varianza total, quedando repartida proporcionalmente entre cada uno de los componentes. La matriz factorial suele presentar un número de factores superior al necesario, ya que

normalmente son los primeros factores los que pueden explicar la mayor parte de la variabilidad total. Por lo tanto, se debe conservar un número reducido de factores, eligiéndolos con algún criterio. Uno de esos criterios se basa en conservar aquellos componentes cuyos valores propios (eigenvalues) son mayores a la unidad. Este criterio tiende a sobreestimar el número de componentes. Otro criterio consiste en la selección de acuerdo al gráfico de “eigenvalue” en función del número de componentes. Cuando el autovalor tiende a quedar constante indica que conservar más factores no aporta una mayor explicación de la variabilidad observada.

Una vez determinado el número de componentes se pueden representar los datos sobre un gráfico donde cada componente está representado por un eje. Esto permite detectar agrupamientos y tendencias dentro de los datos. Este tipo de gráfico se denomina diagrama de puntos.

Un recurso para la mejor interpretación de los componentes es la rotación de los mismos. Rotar significa realizar un cambio de los ejes de referencia sobre el origen hasta que se alcanza otra posición. El efecto de la rotación es redistribuir la varianza para obtener un patrón de componentes con mayor significado, indicando una asociación positiva o negativa clara entre las variables y el factor (o una ausencia de asociación si el valor está cercano a 0). En el presente trabajo se usó el método Varimax que maximiza la suma de varianzas de las cargas requeridas de la matriz de componentes. Este método es el que permite obtener cargas más extremas (cercanas a -1 y 1) y otras cargas cercanas a 0.

Para la aplicación de este análisis se utilizó el software estadístico Minitab 15 (Minitab Inc. 2006, EE.UU).

En el siguiente diagrama de bloque (Figura 2.8) se esquematiza la preparación de las muestras y metodologías aplicadas en este capítulo.

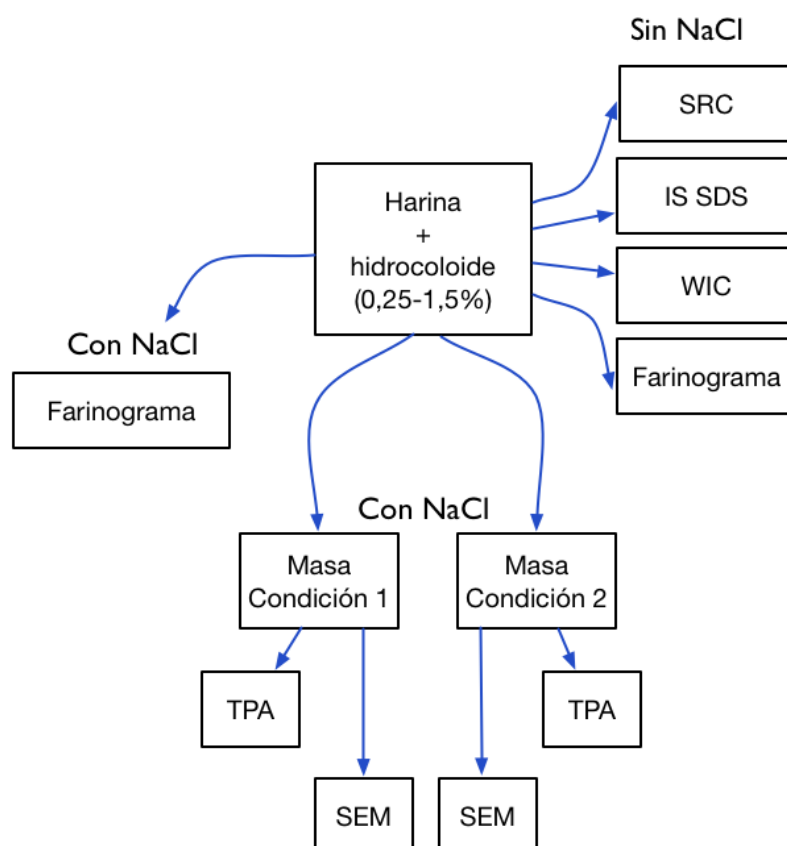


Figura 2.8 Diagrama de bloque de la preparación de las masas y procedimientos aplicados para evaluar la absorción de agua, características reológicas de la harina y mezclas con hidrocoloides. SRC: capacidad de retención de solvente sacarosa; IS SDS: índice de sedimentación con SDS; WIC: capacidad de retención de solvente; TPA: análisis de perfil de textura; SEM: microscopia electrónica de barrido.

2. 4 Resultados

2.4.1 Medición de viscosidad aparente

En la Tabla 2.2 se muestran las viscosidades aparentes de soluciones acuosas de los hidrocoloideos utilizados, en una concentración 10% p/p, obtenidas en un viscosímetro Brookfield (Middleboro, EEUU).

Tabla 2.2 Viscosidad aparente de soluciones de hidrocoloide medida con un viscosímetro Brookfield a 18°C

Hidrocoloideos	Viscosidad Aparente (cps) en solución 1% a 10 rpm
Goma Xantica (GX)	8560
Goma Garrofin (LBG)	75
LBG+GX	8400
Goma Guar (GG)	3370
Pectina de Alto Metoxilo (PE)	10

Puede observarse que las soluciones con GX y LBG+GX y en menor medida la de GG presentan las mayores viscosidades aparentes, lo que está relacionado con un mayor volumen hidrodinámico (Challen y col 1992) y por lo tanto con su capacidad de absorción de agua.

2.4.2 Absorción de agua

En la Tabla 2.3 se muestran los valores de absorción de agua farinográfica (A%) para las mezclas de harina-hidrocoloide sin y con NaCl.

Se observa que los hidrocoloides tienden a aumentar la absorción de agua de las mezclas respecto a la harina control y que el efecto depende del tipo y concentración de la goma agregada, obteniéndose los valores más altos con GX y la mezcla LBG+GX en su mayor concentración.

Los hidrocoloides son macromoléculas altamente hidrofílicas (Glicksman, 1982) lo que conduce a una competencia con las proteínas del gluten por el agua disponible; esto significa que en general, se debe agregar más agua para que pueda desarrollarse la red de gluten. De acuerdo a Tolstoguzov (1997), al menos dos fases acuosas conteniendo proteínas se formarían en la masa: la primera es la fase viscoelástica concentrada conteniendo gliadinas y gluteninas y la segunda una fase coexistente con la primera conteniendo una solución mezcla de albúminas, globulinas y polisacáridos neutros y cargados. Por lo tanto, en la masa de harina de trigo, la hidratación del gluten y la hidratación y disolución de otros componentes son procesos competitivos. El almidón actuaría como un relleno inerte y teniendo en cuenta la facilidad con que se separa por lavado, su afinidad con la fase gluten es baja.

Por otro lado, comparando las mezclas sin y con sal, se observa que los valores de este parámetro fueron menores en presencia de NaCl. El efecto de diferentes aniones, entre ellos el cloruro, sobre la absorción de agua de la masa fue estudiado por Kinsella y Hale, (1984), quienes demostraron que dicho efecto dependía de las características liotrópicas o caotrópicas de los mismos. Particularmente, el anión cloruro actúa como un reforzador de estructura, ordenando el agua de hidratación y favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas de gluten que tienden a permanecer agregadas, lo que conlleva a un endurecimiento de la masa y una menor cantidad de agua necesaria para llegar a la máxima consistencia fijada por el método farinografico (500 UB).

Tabla 2.3 Absorción farinográfica de las mezclas-harina hidrocoloides

		Sin NaCl	Con NaCl
Hidrocoloides	(%)	A (%)	A (%)
Sin goma		63,0	60,2
GX	0,25	64,3	61,2
	0,5	66,3	62,6
	1	68,5	65,0
	1,5	69,8	66,4
GG	0,25	63,4	59,3
	0,5	63,0	59,1
	1	63,5	58,9
	1,5	65,1	62,1
PE	0,25	64,0	59,2
	0,5	65,1	61,2
	1	65,9	62,4
	1,5	67,2	62,0
LBG	0,25	63,6	60,7
	0,5	64,4	62,0
	1	66,4	62,7
	1,5	68,0	66,0
LBG+GX	0,25	64,0	61,8
	0,5	65,4	59,3
	1	67,8	63,6
	1,5	69,8	65,5

Error relativo < 1 % (Norma IRAM 15855)

Sobre las mezclas sin sal, se aplicaron diferentes métodos de absorción de agua (WIC, índice de sedimentación SDS y test SRC sacarosa) que no involucran amasado y por lo tanto no implican desarrollo de la red de gluten.

La disponibilidad de agua para la hidratación de los distintos componentes varía según el método utilizado. En el ensayo farinográfico y el de WIC, el agua no es agregada en exceso, permitiendo que los distintos componentes sean capaces de absorberla. A diferencia del WIC, las medidas farinográficas implican un desarrollo en la red de gluten, que conlleva la hidratación de las proteínas y una mayor absorción de agua. El valor de WIC puede relacionarse con la capacidad de hidratación espontánea del almidón, proteínas y de los hidrocoloides presentes y por lo tanto con la primera fase del amasado.

En los ensayos de índice de sedimentación SDS y SRC sacarosa las soluciones acuosas están en exceso y los componentes responsables de la absorción son proteínas y polisacáridos agregados, respectivamente (Carter y col. 1999). En el caso de este último test, la absorción de agua medida estaría relacionada con la presencia de la goma agregada ya que la harina 000 utilizada, por ser de menor grado de extracción, es pobre en fibra. Por lo tanto, este índice podría estar reflejando, en este caso, las diferencias en hidrofiliidad de los polisacáridos incorporados.

En la Figura 2.9 se observan los resultados de los diferentes tests en las mezclas con hidrocoloides. Algunas tendencias importantes son evidentes, como la mayor absorción de agua en el caso del agregado de GX y la mezcla LBG+GX, independientemente de la metodología utilizada. En particular son remarcables los altos valores obtenidos para el IS SDS con GX y con la mezcla de LBG+GX. La goma xántica como consecuencia de su carácter altamente hidrofílico (Talukdar y col. 1996) produce soluciones con cierto umbral de fluencia (flujo plástico) propiedad que es utilizada habitualmente para estabilizar suspensiones (Glicksman, 1982). Esta propiedad podría explicar los altos valores obtenidos en este índice, enmascarando parcialmente el grado real de hidratación de las proteínas. Por otro lado, la progresiva disminución en el IS SDS por el incremento de la concentración de pectina podría estar indicando una hidratación restringida y una menor expansión de las proteínas de gluten en presencia de este aditivo.

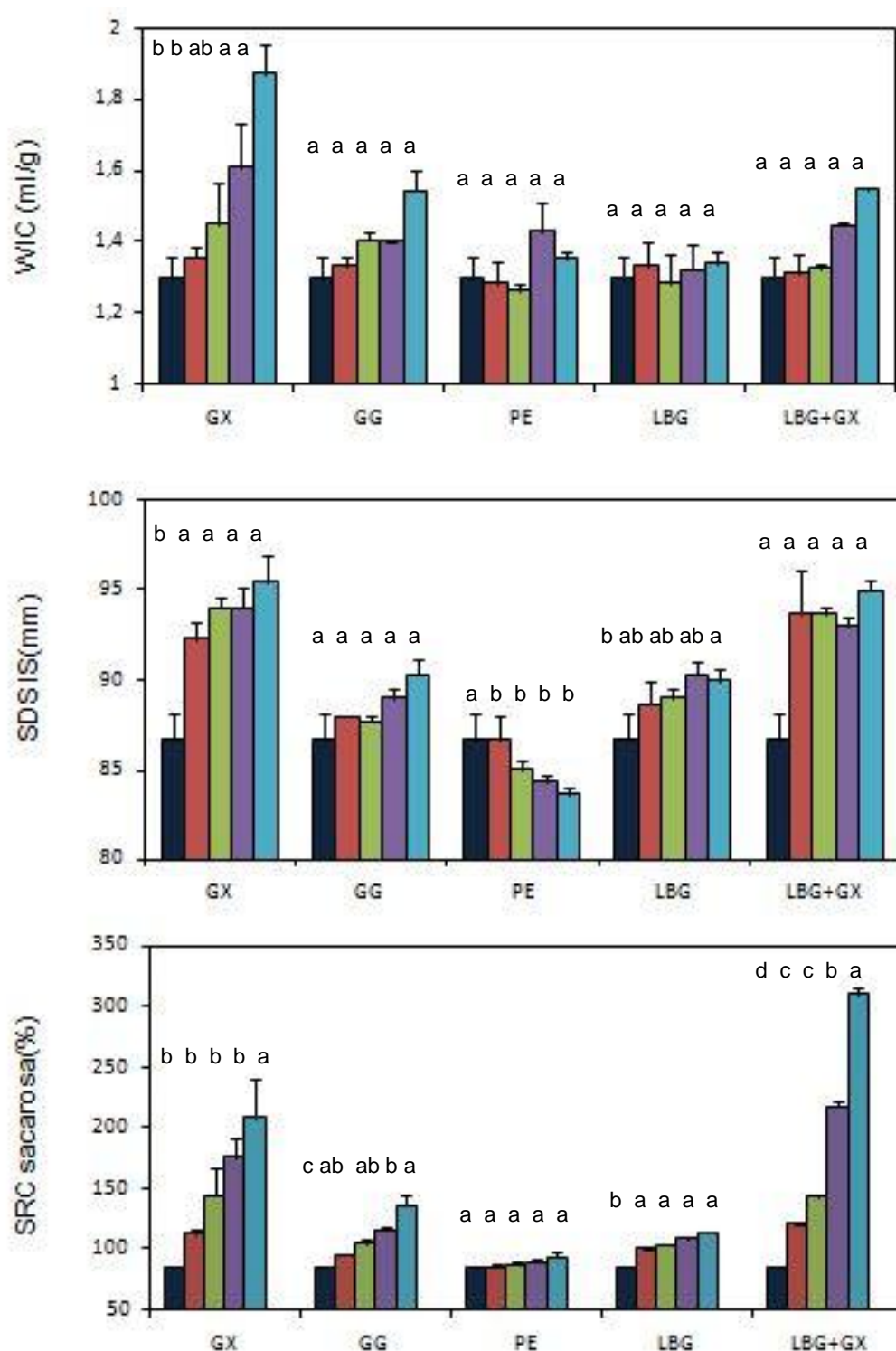


Figura 2.9 Capacidad de absorción de agua (WIC), índice de sedimentación SDS y capacidad de retención de solvente sacarosa (SRC), ● harina sin aditivo; ● 0,25%; ● 0,5%; ● 1%; ● 1,5%. Letras diferentes de comportamiento de absorción indican diferencias significativas (P<0,05). Barra: error típico.

diferentes mezclas, fue aplicado el Análisis de Componentes Principales (ACP). Las variables analizadas quedaron agrupadas en dos componentes (Tabla 2.4). El Componente Principal 1 (CP1) fue definido principalmente por la absorción de agua farinográfica (A) y WIC mientras que el Componente Principal 2 (CP2) se relacionó principalmente con el índice SDS, con alta correlación negativa. El test SRC sacarosa está relacionado, con un grado similar de correlación, con ambos componentes, pero la correlación es positiva en el caso de CP1 y negativa en el de CP2.

De acuerdo con el análisis, el total de la variación en todos los datos fue explicado en un 86,5% por la suma de ambos componentes; correspondiendo al CP1 una varianza explicada del 49,2% y al CP2 de 37,3%.

Tabla 2.4 Cargas y comunalidades asociadas a las componentes principales (CP1 y CP2)

Variable	CP1	CP2	Comunalidad
WIC	0,782	-0,365	0,744
SDS	0,271	-0,947	0,971
SRC	0,682	-0,643	0,878
A	0,904	-0,219	0,865
Varianza	1,967	1,492	3,459
% Var	0,492	0,373	0,865

En la Figura 2.10 se observa el diagrama de puntos de las diferentes muestras en función de ambos componentes.

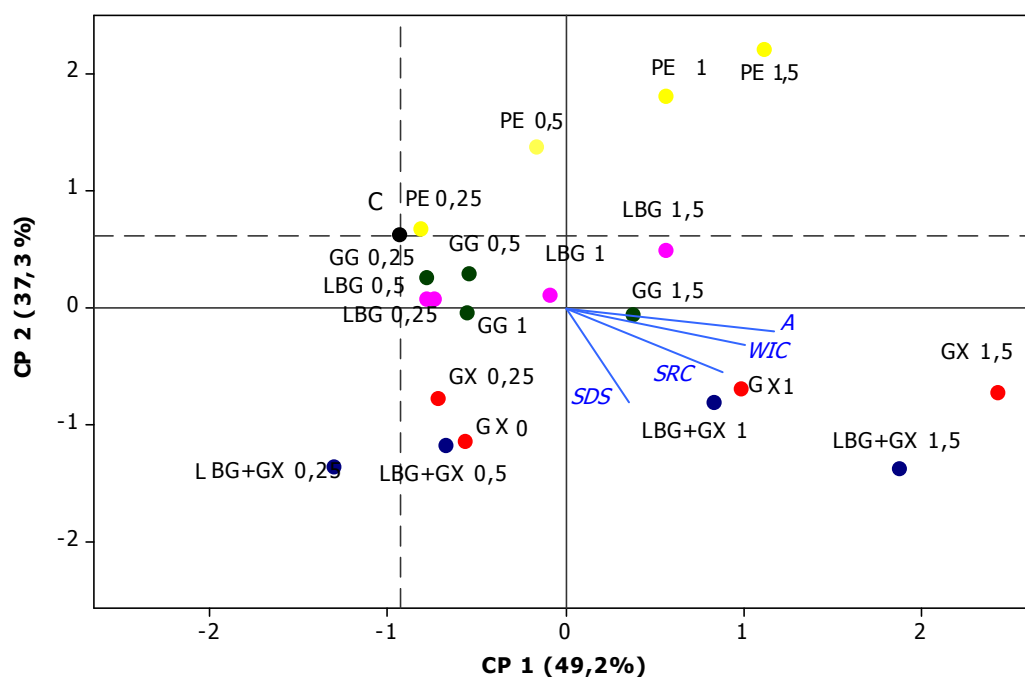


Figura 2.10 Análisis de Componentes Principales considerando los parámetros A, WIC, IS-SDS y SRC sacarosa, para las diferentes mezclas de harina hidrocólide. C: control (en el cruce de las líneas punteadas), GX: goma xántica, LBG: goma garrofin, GG: goma guar, PE: pectina. Los números en los puntos indican la concentración % (en base 100 g harina) de cada goma.

Casi todas las muestras arrojaron altos valores de CP1 y bajos valores de CP2 con respecto al control. Particularmente GX y LBG+GX exhibieron el mayor puntaje en el eje de CP1 y fue evidente una fuerte influencia de la concentración de goma en la absorción de agua.

Todas las muestras con GX y LBG+GX mostraron bajos valores de CP2 como era esperado por los resultados obtenidos en los test SDS y SRC sacarosa (Figura 2.9), que correlacionan negativamente con este componente.

El nivel de GX y LBG+GX afecta de diferente manera a los valores de CP2 que a los valores de CP1.

Por otro lado, las mezclas con PE, mostraron los menores valores en SDS y SRC sacarosa conduciendo a mayores valores de CP2, debido a la correlación negativa entre esta variable y ese componente.

El resto de las muestras (mezclas con GG, LBG y PE en su menor concentración) están agrupadas cerca del control, reflejando una baja influencia del tipo y concentración de hidrocoloide en la absorción de agua de las mezclas.

2.4.3 Análisis reológico de la masa

En la Figura 2.11 se observan los farinogramas obtenidos para las distintas muestras, sin y con sal correspondiente a un nivel de hidrocoloide de 1,5%. En todos los casos se observa un primer máximo a cortos tiempos, dado por la absorción de agua por parte del almidón llegándose a un valor mayor posteriormente. El segundo máximo esta dado por el desarrollo de la red de gluten y es el punto donde se mide, desde el inicio, el tiempo de desarrollo farinográfico. Se observa en la figura un aumento de la estabilidad con el agregado de sal e hidrocoloide, salvo en el caso de PE y LBG.

En la Tabla 2.5, se muestran los valores de tiempo de desarrollo farinográfico (td) y estabilidad (Est.) de las mezclas harina-hidrocoloide.

Para las mezclas preparadas sin sal, el td aumentó con el incremento de las proporciones de GX y GG, mientras que la incorporación de LBG y PE no tuvo influencia en este parámetro. En el caso de GG se observó un aumento de la estabilidad farinográfica (al aumentar la concentración de hidrocoloide agregado) desde un valor de 19,5 minutos hasta 27,0 minutos para el máximo nivel de goma. Esto puede indicar una buena compatibilidad de este hidrocoloide con la red de gluten, produciéndose un refuerzo de la misma, lo que incrementa su resistencia a la acción mecánica. Por el contrario, la

incorporación de PE disminuyó marcadamente la estabilidad de la masa respecto al control desde 19,5 hasta 9,5 minutos.

La adición del 2% de NaCl en la masa sin aditivo (control), condujo a un incremento en el tiempo de desarrollo y la estabilidad. Algunos autores (Galal y col. 1978 y Wehrle y col. 1997) han informado que la sal refuerza la estructura de la masa, reduciendo el efecto del sobreamasado. Al agregar hidrocoloides, habría una superposición del efecto de los factores sal-aditivo.

Diversos autores han informado diferentes efectos en la reología de la masa de pan común y panes libres de gluten (Rosell y col. 2001; Lazaridou y col. 2007, Bárcenas y col. (2009) de acuerdo al tipo de polisacárido agregado. Bárcenas y col. (2009) informaron que los hidrocoloides interactúan con los componentes más importantes de la masa afectando principalmente las propiedades de hidratación del gluten y la gelatinización y retrogradación del almidón. La pectina y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) produjeron un efecto de debilitamiento en el gluten y disminuyeron la viscoelasticidad del sistema durante el calentamiento y enfriamiento. Ribotta y col. (2005) establecieron que algunos hidrocoloides aniónicos como pectina y λ -carragenanos pueden formar complejos hidrofílicos con las proteínas del gluten. Rosell y Foegeding (2007) describieron el efecto de celulosas modificadas (HPMC) en las propiedades del gluten, encontrando que estas celulosas modifican las propiedades viscoelásticas de la masa induciendo a una menor resistencia bajo pequeñas deformaciones y que también interfieren con la asociación y agregación de las proteínas.

Rosell y col. (2001) informaron que el efecto de los hidrocoloides varía dependiendo de su estructura química. Demostraron que con el agregado de goma xántica y alginato en un nivel de 0,5% se incrementó la estabilidad de la masa, mientras que otros hidrocoloides como HPMC y κ -carragenanos disminuyeron este parámetro.

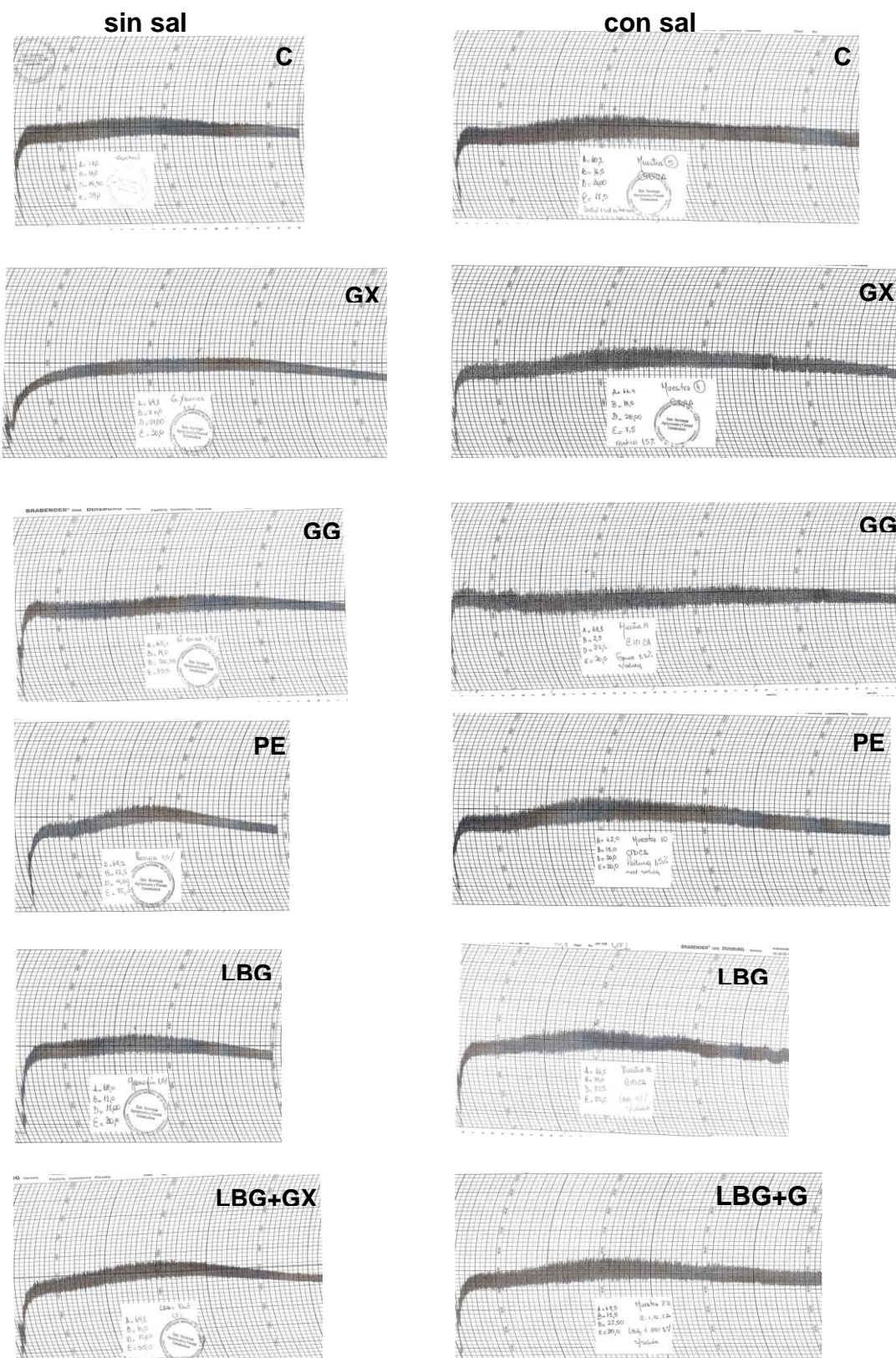


Figura 2.11 Farinogramas de las distintas mezclas sin sal y con sal para un nivel de hidrocoloide de 1,5%.

En nuestro caso en presencia de NaCl, el aumento del nivel de hidrocoloides, con excepción de GG condujo a una disminución de la estabilidad de la masa en todos los casos. Este comportamiento indica una red menos resistente al trabajo mecánico durante el amasado.

Tabla 2.5 Parámetros farinográficos de las mezclas harina-hidrocoloide

		sin NaCl			con NaCl		
Hidrocoloides	(%)	td (min)	Est. (min)	Afl. (UF)	td (min)	Est. (min)	Afl. (UF)
Sin goma		13,0	19,5	35,0	16,5	31,0	17,5
GX	0,25	13,0	18,5	25,0	18,5	31,5	15,0
	0,5	15,0	17,5	27,5	16,0	30,5	25,0
	1	17,0	21,5	32,5	18,0	28,0	5,0
	1,5	20,0	21,0	30,0	18,5	28,0	7,5
GG	0,25	13,5	23,5	20,0	17,0	34,0	20,0
	0,5	18,0	27,5	30,0	20,0	37,0	5,0
	1	17,0	27,0	17,5	16,0	43,5	5,0
	1,5	19,0	27,0	32,5	18,0	37,5	20,0
PE	0,25	12,0	21,5	30,0	19,0	37,0	10,0
	0,5	12,0	11,0	42,5	13,0	25,5	25,0
	1	11,5	12,0	55,0	15,0	28,0	22,5
	1,5	12,5	9,5	75,0	15,0	20,0	20,0
LBG	0,25	12,5	18,5	35,0	14,5	26,5	20,0
	0,5	13,0	19,0	40,0	15,0	26,0	27,5
	1	13,0	19,0	45,0	15,5	28,5	25,0
	1,5	12,0	17,0	30,0	15,0	22,5	25,0
LBG+GX	0,25	11,5	21,0	25,0	15,0	27,0	25,0
	0,5	14,0	20,5	32,5	17,0	34,0	20,0
	1	16,5	16,0	45,0	17,0	26,0	25,0
	1,5	15,0	15,0	55,0	15,5	22,5	30,0

En la Tabla 2.6 se muestran los resultados alveográficos para las masas con niveles de 0,5 y 1,5 % de hidrocoloide. Los datos obtenidos para la harina sin aditivo resultaron más altos ($P/L = 2,1$) que los provistos por el Molino. Probablemente diferencias en el equipo y la operación del mismo han conducido a esta discrepancia. No obstante el objetivo fue realizar un análisis comparativo del efecto de los hidrocoloides.

Tabla 2.6 Parámetros alveográficos de las mezclas harina-hidrocoloide

Nivel	Goma	Hum (%)	P (mmH ₂ O)	L (mm)	W (j)	P/L
0,5%	C	14,2	136 b	64 a	337,5 a	2,1 b
	GX	14,3	162 a	47 b	311,5 a	3,4 a
	GG	14	150,5 ab	61 ab	356 a	2,5 ab
	PE	14,4	150 ab	52 ab	319,5 a	2,9 ab
	LBG	14,2	144,5 ab	62,5 a	351,5 a	2,3 b
	LBG+GX	13,7	143,5 ab	54,5 ab	312 a	2,6 ab
1,5%	C	14,2	136 d	64 a	337,5 a	2,1 d
	GX	14,2	228 a	26,5 c	263,5 b	8,6 a
	GG	14,3	187 b	37 cb	298,5 ab	5,2 b
	PE	14	140 a	53,5 a	301,5 ab	2,6 d
	LBG	14	163 c	47 b	317 ab	3,5 c
	LBG+GX	14,2	180,5 b	42 b	320,5 ab	4,4 b

Dentro de un mismo nivel de hidrocoloide, letras diferentes indican diferencias significativas para un $p < 0,05$.

Cuando los hidrocoloides se agregaron en un nivel de 0,5 %, solamente la goma xántica mostró un aumento significativo de la tenacidad respecto al control. En un nivel de 1,5 % todos los hidrocoloides menos la PE mostraron un aumento significativo de P. Particularmente se observó a 1,5% un marcado aumento en P al agregar goma xántica. Respecto a la extensibilidad (L), se vió disminuida significativamente al agregar GX 0,5 % y con todas las gomas en un

nivel de 1,5 %. El trabajo de deformación alveográfica W no resultó afectado significativamente salvo en el caso de GX al 1,5% en el que disminuyó. Se observó un incremento significativo de P/L en el caso de GX 0,5% y para todas las gomas en los dos niveles, salvo para PE en un nivel de 1,5%. Esto indica que, en general, el agregado de hidrocoloides aumenta la tenacidad y disminuye la extensibilidad (particularmente en el caso de GX) cambiando la forma del alveograma. Sin embargo, hay que destacar que este tipo de ensayo se realiza según la norma, con un contenido de agua determinado por tablas de acuerdo la humedad de la muestra. Esto, sumado a que es un ensayo diseñado para harinas europeas, menos fuertes que las argentinas, hace que haya que interpretar con cuidado los resultados. Como fue descripto, el agregado de hidrocoloide implica en la mayoría de los casos la necesidad del agregado de agua adicional para obtener una masa de adecuada consistencia. Por ello, en este tipo de ensayo, realizado con un nivel constante de solución acuosa de 2,5% NaCl, los cambios en la tenacidad, extensibilidad y relación P/L causados por los hidrocoloides pueden estar sobreestimados.

Los parámetros de perfil de textura de las masas preparadas bajo las diferentes condiciones de hidratación (Condición 1 y Condición 2) se muestran en la Figura 2.12 y 2.13.

Se obtuvieron resultados diferentes de acuerdo a la condición de agua empleada y a la goma utilizada. Según se observa en la Figura 2.12 (A y B), bajo la condición de agua restringida (Condición 1) en la mayoría de los casos se verificó una tendencia a formar masas menos duras que el control con todos los niveles de hidrocoloide. Sin embargo con GX en los dos niveles más altos (1% y 1,5%) y con GG en el nivel más alto (1,5%) se obtuvieron masas mas duras que el control; sugiriendo que en estos niveles estos hidrocoloides probablemente compitieron con las proteínas del gluten por el agua disponible.

A

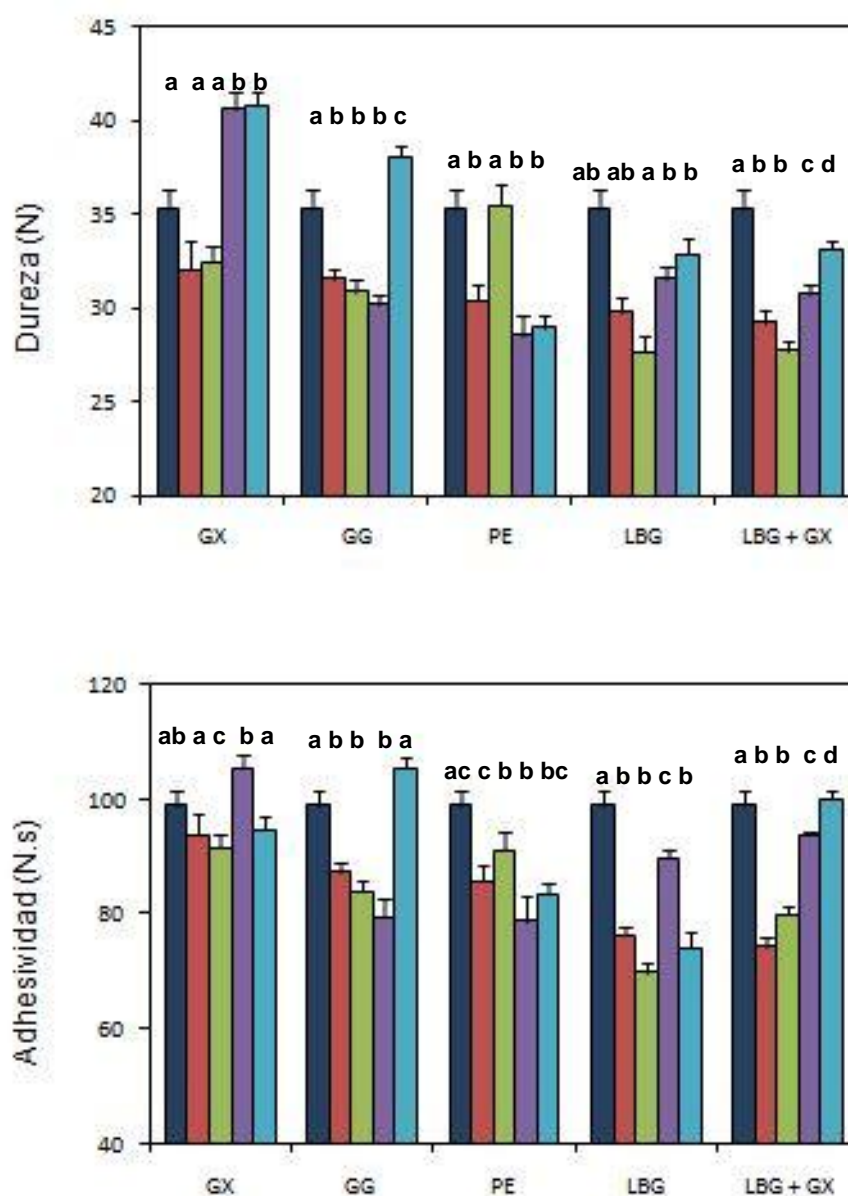


Figura 2.12 A Atributos texturales de dureza y adhesividad de las masas hechas con agua restringida (CONDICION 1). ● Harina sin aditivo; ● 0,25%; ● 0,5%; ● 1%; ● 1,5%. Letras diferentes dentro de un mismo grupo indican diferencias significativas para $P < 0,05$. Barra: error típico

Se observó una disminución de la adhesividad en las masas preparadas con PE y LBG en todas las concentraciones con respecto al control. En el caso de GG y LBG+GX la adhesividad disminuyó en todos los niveles excepto el nivel más alto. Con GX se obtuvieron valores similares al control.

B

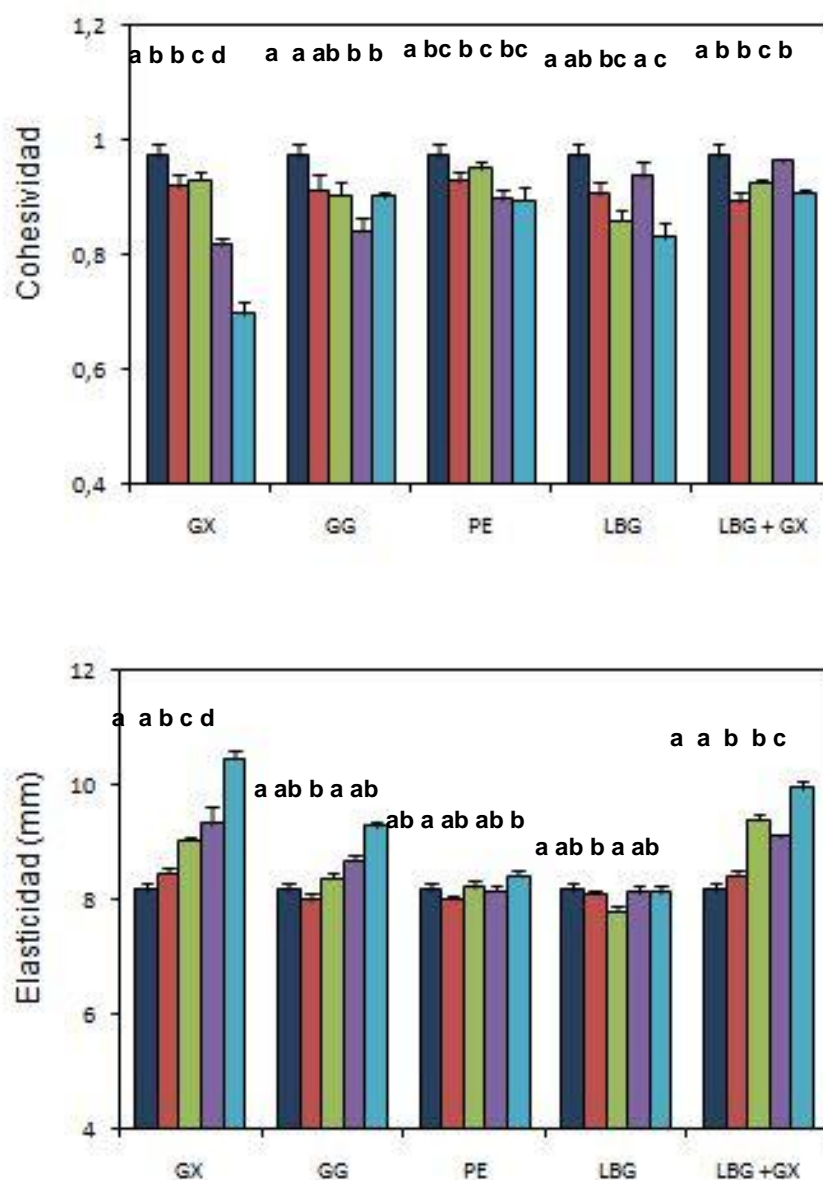


Figura 2.12 B Atributos texturales de cohesividad y elasticidad de las masas hechas con agua restringida (CONDICION 1). ● harina sin aditivo; ● 0,25%; ● 0,5%; ● 1%; ● 1,5%. Letras diferentes dentro de un mismo grupo indican diferencias significativas para $P < 0,05$. Barra: error típico

En la cohesividad, se observó una tendencia a disminuir con el agregado de hidrocoloide en particular con la GX.

La elasticidad aumentó significativamente a medida que se aumentaba la concentración de hidrocoloide en los casos de GX y LBG+GX mientras que para GG, PE y LBG no se observaron diferencias respecto al control.

Bajo la Condición 2 (Figura 2.13), se observó una mayor tendencia a disminuir la dureza que en la Condición 1, excepto con la GG en donde la dureza se mantuvo en valores similares al control. La disminución fue particularmente pronunciada con PE, LBG y LBG+GX.

Como en el caso de las masas con agua constante (Condición 1), la adhesividad tendió a disminuir con el agregado de hidrocoloide excepto con GG donde se observó un aumento significativo a partir de una concentración de 0,5%.

En la cohesividad se observó un comportamiento similar al obtenido en la Condición 1, es decir una disminución con el agregado de hidrocoloide aunque no hubo un efecto marcado de la concentración.

Se observa un aumento significativo de la elasticidad en el caso de GX y GG a medida que aumenta la concentración. Para LBG se observó una tendencia a disminuir y con PE se obtuvieron valores similares al control.

El decrecimiento en la dureza y en la cohesividad de la masa está probablemente relacionado con la interacción entre los hidrocoloides, la red de gluten y el agua. Esta interacción podría afectar negativamente la integración de los diferentes componentes de la masa.

El comportamiento de la pectina resultó particularmente distinto ya que fue independiente de la disponibilidad de agua. Este hecho podría indicar que este hidrocoloide no compite o compite en menor grado con las proteínas del gluten por el agua disponible durante el amasado, como fue reflejado por los diferentes ensayos de absorción en donde la pectina mostró los menores valores en comparación con los otros hidrocoloides. El agregado de PE condujo a la disminución de la dureza de la masa, particularmente en

concentraciones mayores a 1 %. Las masas más blandas obtenidas en condiciones de agua adaptada pueden deberse a una interacción PE-gluten que impedirían un desarrollo adecuado de la red. Contrariamente a lo observado para PE, la incorporación de GG puede contribuir a la formación de una red de gluten más resistente, lo que se puede inferir del incremento de la estabilidad farinográfica, probablemente por interacciones específicas.

C

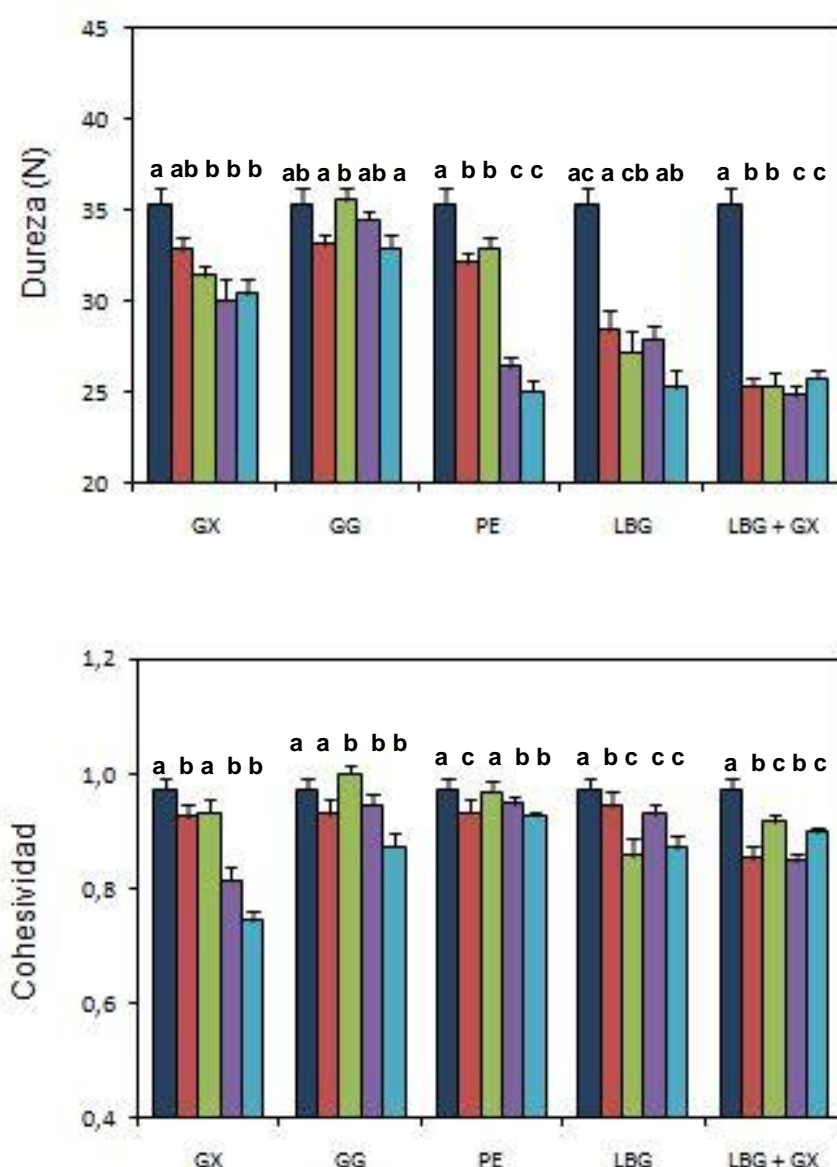


Figura 2.13 C Atributos texturales de dureza y cohesividad de las masas hechas con agua adaptada (CONDICION 2). ● harina sin aditivo; ● 0,25%; ● 0,5%; ● 1%; ● 1,5%. Letras diferentes dentro de un mismo grupo indican diferencias significativas para $P < 0,05$. Barra: error típico

Estas interacciones llevarían además a una red de gluten capaz de liberar agua, conduciendo a masas más adhesivas.

Comparando los resultados obtenidos bajo las dos condiciones, la disponibilidad de agua parece no afectar todos los atributos texturales de la misma manera. La dureza y adhesividad serían más influenciados por la cantidad de agua disponible y el tipo de hidrocoloide.

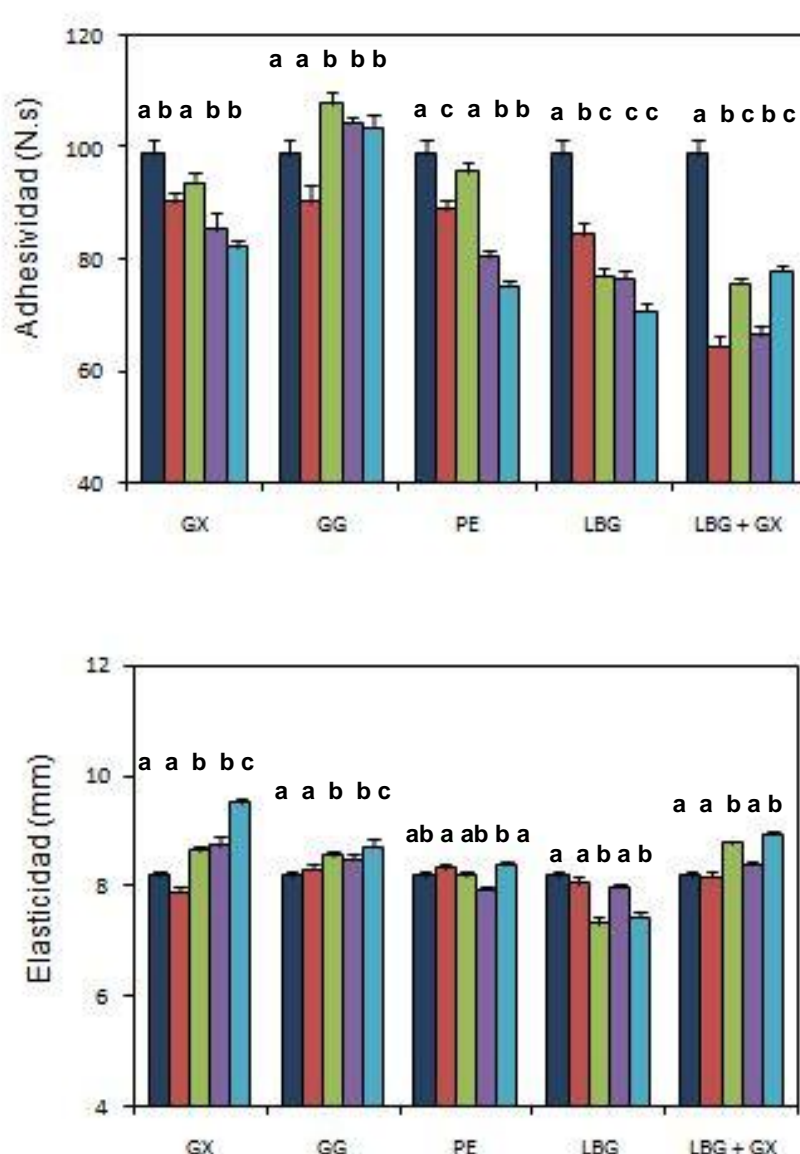


Figura 2.13 D Atributos texturales de cohesividad y elasticidad de las masas hechas con agua adaptada (CONDICION 2). ● harina sin aditivo; ● 0,25%; ● 0,5%; ● 1%; ● 1,5%. Letras diferentes dentro de un mismo grupo indican diferencias significativas para $P < 0,05$.

Barra: error típico

Estos parámetros estarían más relacionados con la capacidad de ligar agua de los componentes de la masa; capacidad asociada no sólo a su hidrofiliidad intrínseca, sino también a las interacciones que se establecen entre ellos.

Se analizaron los parámetros texturales obtenidos mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA). En la Tabla 2.7 se muestran los valores de las cargas y comunalidades asociados a las componentes principales. Para la Condición 1 el Componente Principal 1 (CP1) fue principalmente definido por los atributos texturales de dureza, adhesividad y elasticidad, observándose una correlación positiva y el Componente Principal 2 (CP2), principalmente por la cohesividad con una alta correlación negativa. Para las masas preparadas con nivel constante de agua (Condición 1), el total de la variación en los datos fue explicado en un 86,3%; correspondiendo al CP1 un 52,3% de la variación y al CP2 el 34,0%.

Tabla 2.7 Cargas y comunalidades asociadas a las componentes principales (CP1 y CP2)

	CONDICION 1			CONDICION 2		
Variable	CP1	CP2	Comunalidad	CP1	CP2	Comunalidad
Dureza	0,829	0,354	0,813	0,951	-0,039	0,905
Adhesividad	0,973	-0,155	0,971	0,981	-0,017	0,963
Cohesividad	-0,066	-0,982	0,969	0,537	0,704	0,785
Elasticidad	0,673	0,495	0,697	0,249	-0,891	0,855
Varianza	2,0912	1,3588	3,4500	2,2175	1,2912	3,5086
% Var	0,523	0,340	0,863	0,554	0,323	0,877

En la Figura 2.14 A se observan los resultados del análisis para las muestras preparadas bajo la Condición 1. Como se puede ver todas las muestras tienen mayores valores de CP2 que el control, indicando una tendencia a disminuir la cohesividad cuando se agrega hidrocoloide. Respecto a CP1, la mayoría de las muestras con hidrocoloide se localizan debajo del control indicando masas

blandas, menos adhesivas y menos elásticas. La excepción a este comportamiento son las muestras con GX en niveles de 1 y 1,5%, LBG+GX 1,5% y GG 1,5%. Una característica mostrada en la Figura 2.14 A es que la mayoría de las muestras están agrupadas en una región bien delimitada del gráfico, sin una fuerte diferenciación de acuerdo al tipo y concentración de goma excepto por las muestras mencionadas anteriormente.

Para la Condición 2 (agua variable) las variables texturales quedaron definidas por dos componentes principales. CP1 fue definido principalmente por la dureza y adhesividad con correlación positiva. El CP2 se relacionó con la cohesividad, con correlación positiva, y con la elasticidad, con una correlación negativa. Ambos componentes explicaron un 87,7% del total de la varianza original, para el Componente Principal 1 (CP1) correspondió un 55,4% y para el Componente Principal 2 (CP2) 32,3% (Tabla 2.6).

Como se observa en la Figura 2.14 B, las muestras resultaron más dispersas que en la Condición 1 (Figura 2.14 A) indicando una mayor diferenciación de los atributos de textura entre las muestras, dependiendo del tipo y el nivel de hidrocoloide agregado y del agua disponible. A excepción de las muestras con GG en los niveles 0,5 y 1 %, no se observaron valores de dureza y de adhesividades mayores que para el control. Las otras gomas condujeron a masas más blandas y menos adhesivas, particularmente con el agregado de LBG aunque no se pudo observar una tendencia definida en función de la concentración de hidrocoloide en ningún caso. LBG+GX también condujo a masas más blandas, mientras que bajo la condición de restricción de agua (Condición 1) se había observado el comportamiento opuesto. Con respecto a CP2, la mayor parte de las muestras se localizaron cercanas al control, excepto las muestras con GX en concentraciones de 1 y 1,5%, LBG+GX 1,5% y GG 1,5% que mostraron un comportamiento menos cohesivo pero más elástico respecto al control.

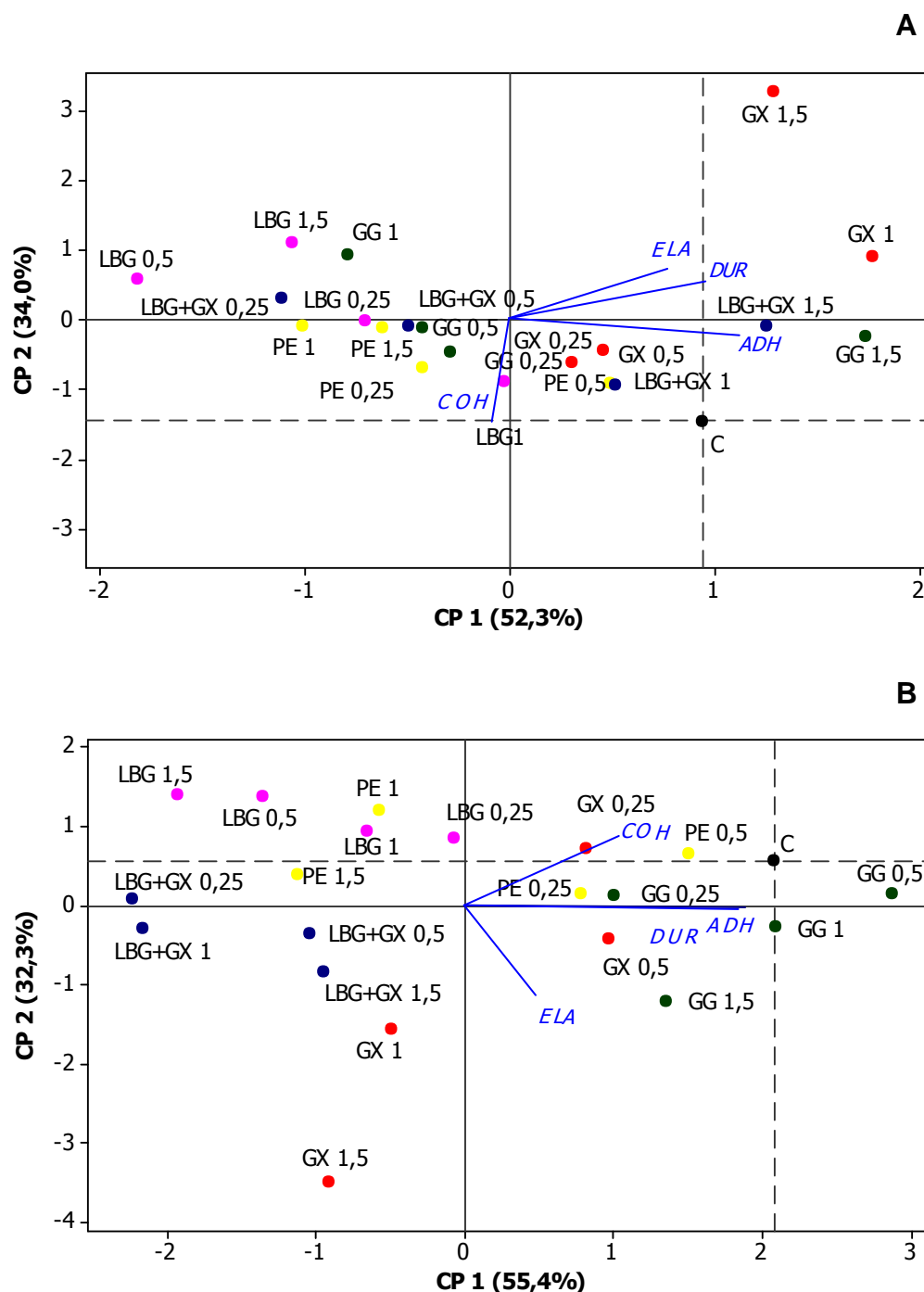


Figura 2.14 Análisis de Componentes Principales, considerando los parámetros de dureza, cohesividad, adhesividad y elasticidad de las masas elaboradas en dos condiciones; A) con nivel de agua constante (Condición 1) B) con agua variable, farinográfica (Condición 2). C: control, GX: goma xantica, LBG: goma garrofin, GG: goma guar, P: pectina. Los números en los puntos indican la concentración % p/p de cada goma.

Bajo ambas condiciones, con restricción de agua (Condición 1) y con agua ajustada según los datos farinográficos (Condición 2) se observó una tendencia a decrecer de la cohesividad cuando se incrementó la concentración de hidrocoloide. El hidrocoloide que ejerció la mayor influencia en los atributos texturales fue GX. La particular estructura rígida de esta goma (Glicksman 1982) podría estar relacionada con el decrecimiento de la cohesión de las partículas de la red de gluten. Otro aspecto común encontrado en ambas condiciones fue la disminución en la dureza cuando se agregaron los hidrocoloides, excepto en los casos de agregado de GX y GG en el mayor nivel. Estos cambios en el comportamiento de la masa están sugiriendo una interacción entre el hidrocoloide y otros componentes, particularmente las proteínas que conforman la red de gluten. Como así también, una relación dependiente de la cantidad de agua. Otros autores han informado la existencia de interacciones de este tipo. Ribotta y col. (2005) han informado que con el agregado de ciertos hidrocoloides aniónicos como λ -carragenano y pectina se produce un refuerzo de la masa, lo que fue detectado como un incremento en la resistencia extensográfica (R_m). Estos autores atribuyeron este efecto a la formación de un complejo aniónico entre el hidrocoloide y las proteínas de gluten, sin descartar la contribución que pudieran tener los puentes hidrógeno, que poseen particular importancia en el caso de los polisacáridos neutros.

En el presente trabajo, el agregado de goma guar, un hidrocoloide neutro, incrementó la estabilidad y no produjo disminución de la dureza cuando la disponibilidad de agua fue suficiente (Condición 2, Figura 2.14 B). GX, que es un hidrocoloide aniónico, no afectó mayormente la estabilidad pero introdujo importantes cambios en los atributos texturales de la masa, dependiendo de la disponibilidad de agua. La adición de pectina, otro polisacárido aniónico, condujo a masas más blandas y menos estables. Este polisacárido tiene una cadena más flexible que GX y GG y menor peso molecular (Correa y col. 2011; Pecivovay col. 2011; Majzoo y col. 2011). De estos resultados, se puede concluir que la posibilidad de interacción con la red de gluten y otros componentes de la masa y el consecuente cambio en el comportamiento

reológico se podría interpretar como el resultado de varios factores simultáneos: carácter iónico, conformación, flexibilidad y tamaño de las cadenas del polisacárido. Se puede afirmar además que los resultados obtenidos con un cierto hidrocoloide están fuertemente influidos por la composición de la matriz de la masa y particularmente la disponibilidad de agua.

2.4.4 Microscopia de la masa

En la Figura 2.15 se observan las micrografías de la masa preparada con las diferentes gomas en el nivel 0,5% y la masa sin agregado de aditivos (control) preparadas bajo la condición de óptima hidratación (CONDICION 2). Las muestras preparadas bajo CONDICION 1 no mostraron diferencias apreciables con los niveles de aumento utilizados respecto a las preparadas con agua adaptada.

Como se puede ver en el caso del control, la red de gluten envuelve a los gránulos de almidón como una delgada lámina donde se pueden apreciar disrupciones. Con el agregado de PE, la matriz de gluten se ve semejante a la masa control. GG y PE son los hidrocoloides que conducen a una red de gluten más integrada. Por el contrario, LBG presenta la matriz más disgregada, lo que también se ve reflejado por la disminución de la dureza en el nivel de 0,5%.

Estos resultados confirman el hecho de que aún en presencia de hidrocoloides, se ha desarrollado de manera satisfactoria la red de gluten. Resultados similares fueron obtenidos cuando se emplearon altas concentraciones de goma, aún a 1,5%. En la Figura 2.16 se observa que el agregado de hidrocoloides en un nivel 1,5% llevó a la formación de una microestructura diferente a la masa control. En el caso de las masas elaboradas GX y LBG+GX presentaron una matriz proteica más abierta y porosa que en las masas preparadas con PE, GG y LBG que fueron similares al control.

.

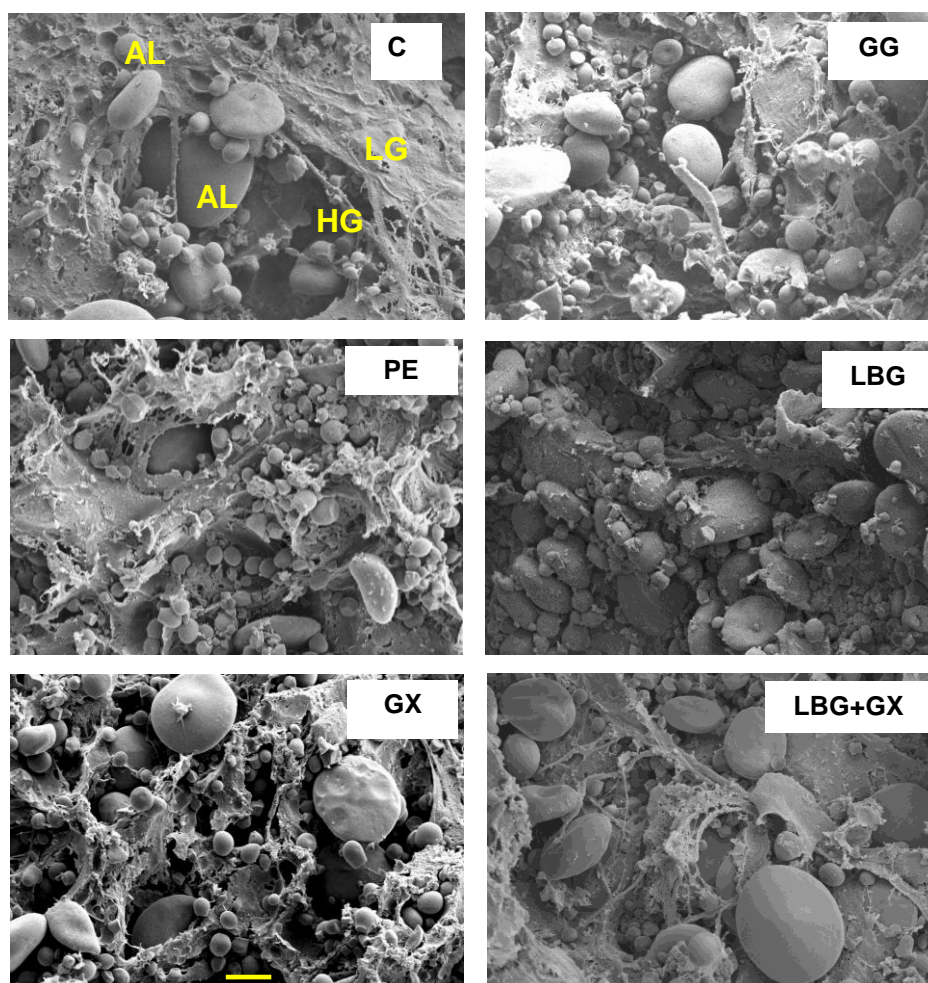


Figura 2.15 Micrografías de las masas con los diferentes hidrocoloides en la concentración 0,5% bajo la Condición 2 de agua. LG: lámina de gluten, HG: hebra de gluten; AL: almidón. Barra de la escala = 10 μm .

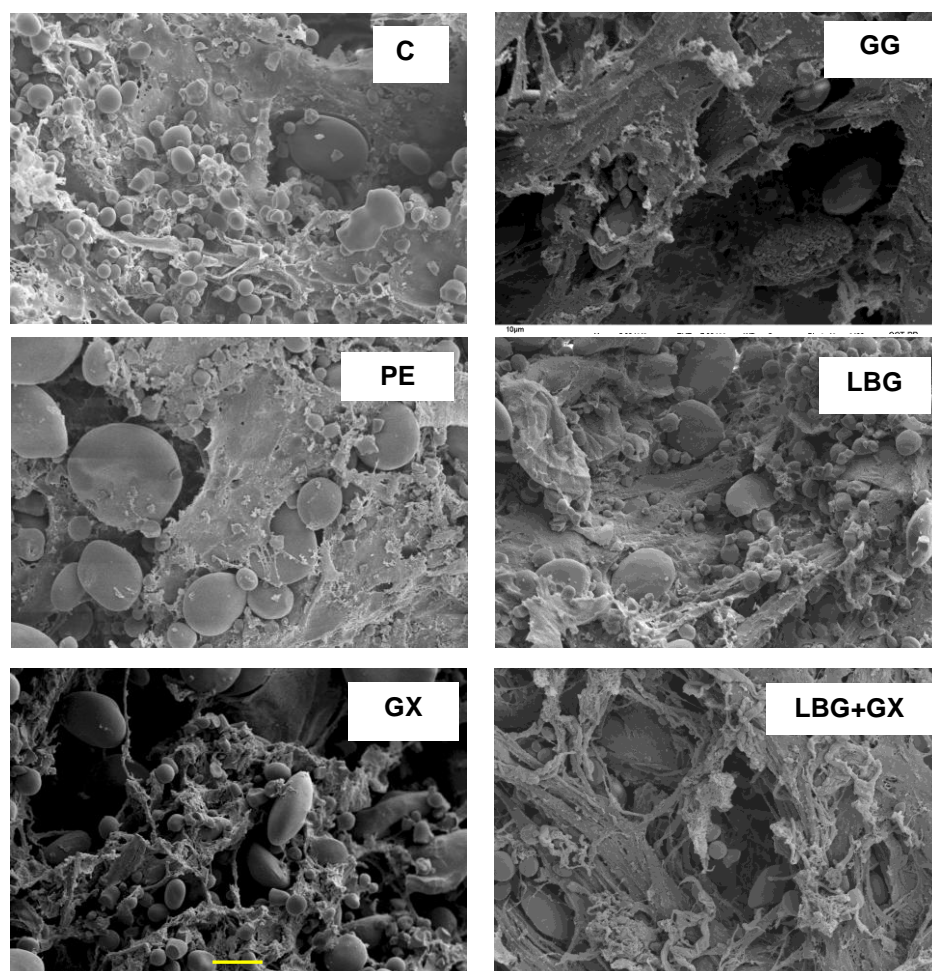


Figura 2.16 Micrografías de las masas con los diferentes hidrocoloides en la concentración 1,5% bajo la Condición 2 de agua. Barra de la escala = 10 μm .

2.5 Conclusiones parciales

Se utilizaron diferentes metodologías, usualmente aplicadas en harinas y aislados proteicos, para caracterizar el comportamiento de absorción de agua de las gomas cuando se incorporan a una matriz compleja como la harina de trigo. La absorción de agua de las mezclas fue afectada por el tipo y nivel de goma agregada, contenido de cloruro de sodio y el desarrollo o no de la red de gluten. Las mezclas de harina con GX tuvieron los mayores valores de absorción de agua en todos los ensayos, seguido por la mezcla de LBG+GX.

La estabilidad farinográfica dependió del tipo de hidrocoloide incorporado; las mezclas con el agregado de GG llevaron a una masa más estable, la adición de GX no marcó un cambio importante en este atributo y las masas con PE resultaron menos estables.

De acuerdo al análisis de perfil de textura se obtuvieron masas más blandas y menos cohesivas con el agregado de hidrocoloide en la mayoría de los casos. Mientras que bajo condiciones de restricción de agua se obtuvieron masas más duras con el agregado de GX y GG en los niveles más altos.

Estos resultados indican que las diferentes características estructurales y físicas de los hidrocoloides influyen en la cantidad y tipo de interacción entre las gomas y la matriz de la masa. Estas interacciones también son afectadas por otros factores como, la presencia de NaCl y disponibilidad de agua. El nivel de agua es un factor determinante que influye en los atributos texturales; cuando se agrega agua en cantidad suficiente, se observan mayores variaciones en las características texturales de la masa por una mayor influencia del hidrocoloide hidratado lo que indicaría diferencias en el tipo de matriz obtenida.



Capítulo 3

Interacción de los hidrocoloides con los principales componentes de la masa

3.1 Introducción

Las características macroscópicas de la masa, como la capacidad de absorber agua y el comportamiento reológico están estrechamente asociadas a sus características microestructurales. En general, la dilucidación de las interacciones entre componentes en un sistema complejo como la masa panaria requiere del uso combinado de diversas técnicas (Lefebvre, 2007).

Entre las técnicas que se pueden utilizar para la caracterización microestructural de las masas y que se aplicarán en el presente capítulo se encuentran los ensayos de movilidad molecular por resonancia magnética nuclear (NMR), el estudio de la conformación de las proteínas de gluten por espectroscopia (FT-Raman), la determinación de agua congelable, la determinación de parámetros de desnaturalización proteica y de gelatinización de almidón por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis de los perfiles proteicos de las fracciones de gliadinas y gluteninas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE). Se describen a continuación los fundamentos de cada una.

3.1.1 Movilidad molecular a través de ensayos de relajación T2 (^1H -RMN)

Mediante esta metodología se puede evaluar la cantidad relativa y movilidad de los protones presentes en la masa, correspondientes principalmente al agua.

Este tipo de espectroscopía se basa en la aplicación de un campo magnético externo bajo el cual los núcleos paramagnéticos que tienen un spin nuclear distinto de cero, tales como ^1H y ^{13}C absorben radiación en el rango de radiofrecuencia del espectro electromagnético.

Un núcleo con spin $\frac{1}{2}$ tiene dos posibles orientaciones que son de igual energía en ausencia de un campo magnético externo. Si se aplica un campo, los niveles energéticos se dividirán en dos, de menor y de mayor energía, con distinto número cuántico magnético m (Figura 3.1).

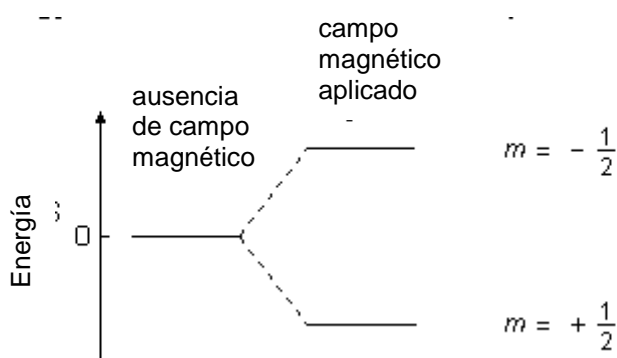


Figura 3.1 Niveles de energía del núcleo con número cuántico $\frac{1}{2}$ spin.

Adaptado de Sheffield Hallam University (acceso: febrero 2014).

Las poblaciones iniciales de cada nivel de energía son diferentes: habrá un mayor número de núcleos en el nivel de menor energía y es posible excitarlos con radiación electromagnética. La frecuencia de dicha radiación quedará determinada por la brecha energética entre ambos niveles.

Existen distintas variantes de la técnica. En el caso de ^1H -NMR pulsado, los núcleos H son excitados por pulsos de pocos milisegundos de radiación electromagnética a la frecuencia resonante; los núcleos quedan alineados en una sola dirección y cuando los pulsos cesan los núcleos vuelven a su estado original emitiendo una señal (Figura 3.2).

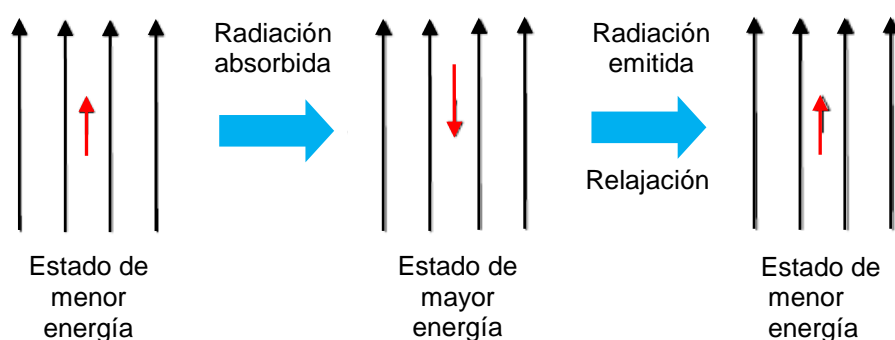


Figura 3.2. Excitación y relajación de un núcleo. Adaptado de Royal

Society of Chemistry (acceso: febrero 2014).

La amplitud de la señal es proporcional al número de núcleos de hidrógeno en la muestra y decrece en función del tiempo, lo que está caracterizado por las constantes o tiempos de relajación T . Un menor tiempo de relajación está relacionado con una menor movilidad de los protones en el sistema (Bruker Minispec Application).

Existen dos tipos de tiempos de relajación: T_1 y T_2 . El primero (longitudinal) representa el tiempo del proceso de primer orden que lleva a los núcleos nuevamente al equilibrio, a lo largo del eje Z . T_2 es el tiempo de la relajación transversal, que ocurre en el plano XY (ancho de la señal) y que está influenciada por las inhomogeneidades del campo magnético aplicado. Para corregir el efecto de estas inhomogeneidades se aplica una secuencia de pulsos denominada de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) que permite reenfocar la magnetización exactamente en el plano XY (Department of Chemistry, Queens University 2005-2006).

Los ensayos de relajación $^1\text{H-NMR}$ (T_2) han sido utilizados para estudiar la movilidad molecular en diferentes tipos de sistemas alimentarios (Leung y col., 1976; Ruan y col. 1976; Chen y col. 1997; Herrera y col. 2007).

Leung y col. (1979) estudiaron la movilidad del agua en masas preparadas a partir de diferentes trigos y hallaron dos fracciones diferentes: agua móvil (con mayor tiempo de relajación) y agua inmóvil (con menor tiempo de relajación). También encontraron que las movilidades de agua de masas sub y sobrehidratadas eran diferentes a aquellas obtenidas con masa preparada en condiciones de hidratación óptima. Trabajos más recientes han informado también sobre resultados de estudios de RMN aplicados a las diferentes etapas de la panificación desde la masa hasta la obtención del pan (Egelsen y col. 2001, 2003).

3.1.2 Transiciones térmicas del sistema por calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que se basa en la determinación de la diferencia del flujo de calor necesario para mantener la muestra en estudio y una referencia a la misma temperatura cuando ambas son sometidas a un programa controlado de calentamiento (Lund, 1983). Un sistema puede sufrir transiciones que involucren cambios en la entalpía (transiciones de primer orden) y esto conlleva a una toma o cesión de calor que se observa como un pico en el termograma (endo o exotérmico). Cuando esto no ocurre en el rango de temperaturas ensayado no se observan picos. El área del pico se puede relacionar con la entalpía involucrada (por ejemplo de cristalización o fusión, en la Figura 3.3) a través de constantes de calibración. A partir del termograma se pueden determinar también las temperaturas inicial, de pico y final que caracterizan la transición.

Las transiciones de segundo orden como el pasaje de estado sólido amorfo a un estado gomoso de mayor movilidad (transición vítrea) involucran un cambio en la capacidad calorífica del sistema y se observan como un salto en la línea de base del termograma que precede a las transiciones de primer orden (Figura 3.3) (Roos, 1995).

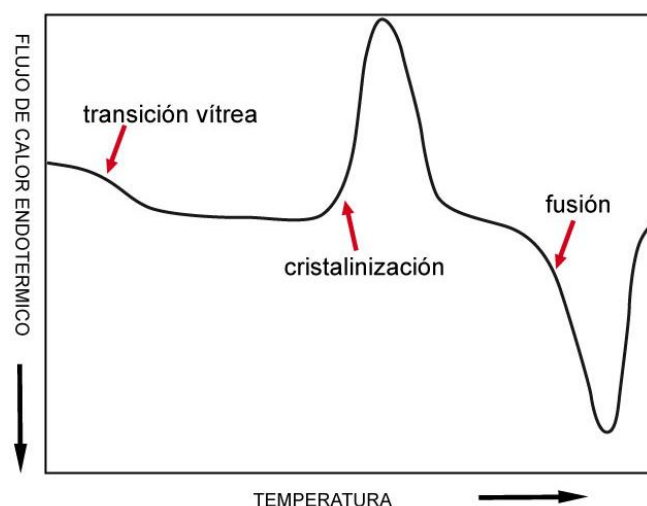


Figura 3.3 Representación esquemática de un termograma donde se diferencian las transiciones de primero y segundo orden. Adaptado de Roos (1995).

En la masa de harina de trigo la calorimetría resulta útil para estudiar los fenómenos de gelatinización y retrogradación de almidón y desnaturalización proteica (Primo y col. 2007; Ribotta y col. 2003, León y col. 2000), transición vítrea (Cuq y col. 2003) y cantidad de agua congelable (Ribotta y col. 2007).

3.1.3 Estructura de las proteínas de gluten

Las propiedades de la masa están estrechamente relacionadas con una adecuada formación de la red de gluten. Una masa desarrollada tiene propiedades de viscoelasticidad únicas, como resultado de la hidratación de las proteínas, y de su desdoblamiento y orientación mediado por un intercambio complejo entre los grupos sulfhidrilo (S-H) y los puentes disulfuro (S-S) presentes en el gluten (Campos y col. 1997; Shewry y col. 2001). La interacción de los hidrocoloides con las proteínas del gluten es un punto crítico de estudio y las técnicas espectroscópicas y electroforéticas pueden ser herramientas valiosas para analizar la conformación de la red.

3.1.3.1 Espectroscopía FT-Raman

La espectroscopía RAMAN permite obtener información acerca de la estructura de un compuesto en base a las rotaciones, vibraciones y otros modos de baja frecuencia de las moléculas. Se basa en la dispersión de un haz de luz monocromático, usualmente láser, en el visible, infrarrojo cercano o ultravioleta cercano cuando interactúa con los electrones del sistema. Tales interacciones inducen oscilaciones periódicas en los electrones del compuesto provocando un cambio en los estados vibracionales, rotacionales o electrónicos de una molécula. Esto se traduce en corrimientos energéticos (denominados “shift”) que dan información sobre los modos vibracionales del sistema. La espectroscopía Raman convencional mide la intensidad de la radiación como

una función de la frecuencia (o del número de onda). Cada compuesto exhibe un conjunto de bandas características.

Por otro lado, en los instrumentos con transformada de Fourier (FT), en lugar de registrar los datos variando la frecuencia de luz monocromática, se guía la luz con múltiples longitudes de onda a través de un interferómetro. Después de pasar por la muestra, la señal medida da el interferograma. La realización de una transformada de Fourier permite pasar de una señal en función del tiempo a una señal en función de la frecuencia produciendo un espectro idéntico al de la espectrometría convencional. Las ventajas de utilizar FT-Raman son una mejora en la resolución, en el tiempo de adquisición del espectro (mayor rapidez) y en la razón señal-ruido (mayor razón).

En la Figura 3.4 se observa un diagrama típico Raman donde se pueden distinguir las bandas, a diferentes números de onda correspondiente a cada tipo de conformación de una proteína.

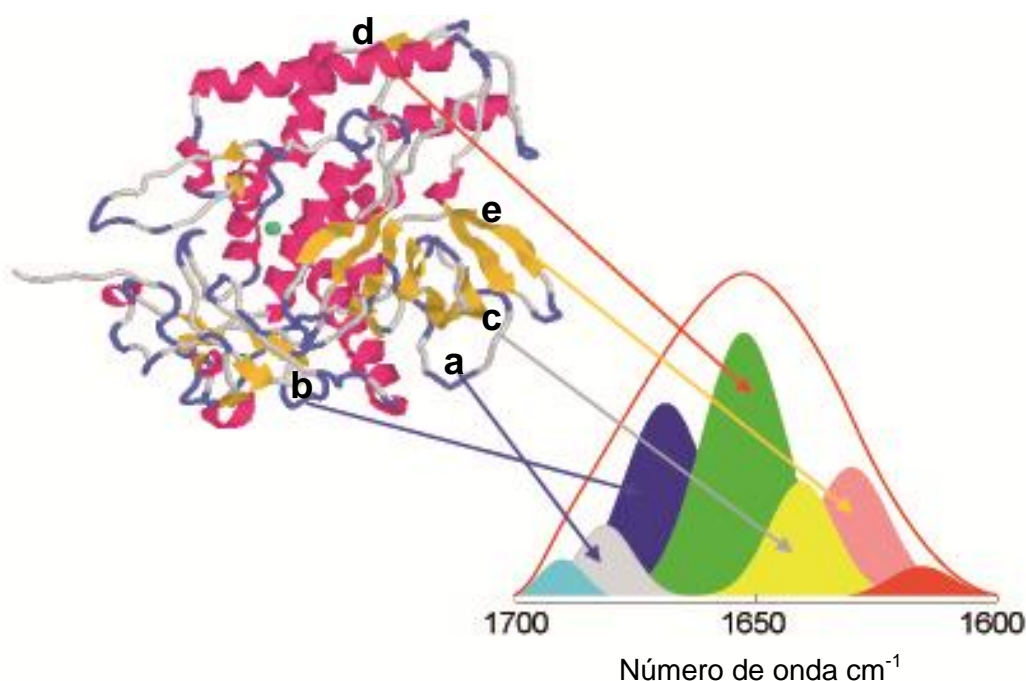


Figura 3.4 Descomposición de la banda Amida I en sus bandas componentes y asignación a distintos tipos de estructura secundaria; a) hoja plegada β antiparalela; b) giro β ; c) estructura al azar; d) α -hélice; e) hoja plegada β . Adaptado de Encinar Hidalgo (acceso: febrero 2014).

Por otro lado, el análisis de vibración de las cadenas secundarias también da valiosa información sobre la conformación proteica. La banda triptófano (760 cm^{-1}) ha sido propuesta para ser usada como un indicador de la fuerza de las uniones puente de hidrógeno y de la hidrofobicidad del entorno del anillo de indol. La relación del doblete tirosilo localizado en 850 y 830 cm^{-1} ($I_{850/830}$) se conoce como un buen indicador de los puentes de hidrogeno del grupo hidroxifenólico.

Se ha relacionado una disminución de la relación $I_{850/830}$ con el incremento del ocultamiento del grupo, sugiriendo una posible participación de los residuos tirosilo en interacciones intra e intermoleculares. Por el contrario, la banda de 850 cm^{-1} se hace más intensa que la banda a 830 cm^{-1} cuando los residuos tirosina resultan expuestos.

La vibración del estiramiento disulfuro ($500\text{-}550\text{ cm}^{-1}$) es comúnmente examinada para evaluar cambios conformacionales, ya que el puente disulfuro es muy importante en el mantenimiento de una estructura terciaria particular de la proteína. La vibración de estiramiento-simétrico de la unión S-S está influenciada por la conformación de los átomos de C en el puente disulfuro. La vibración a 510 cm^{-1} puede ser asignada al rotámero gauche-gauche-gauche (g-g-g), la banda a 525 cm^{-1} al gauche-gauche-trans (g-g-t) y la vibración a 540 cm^{-1} al trans-gauche-trans (t-g-t) (Figura 3.5).

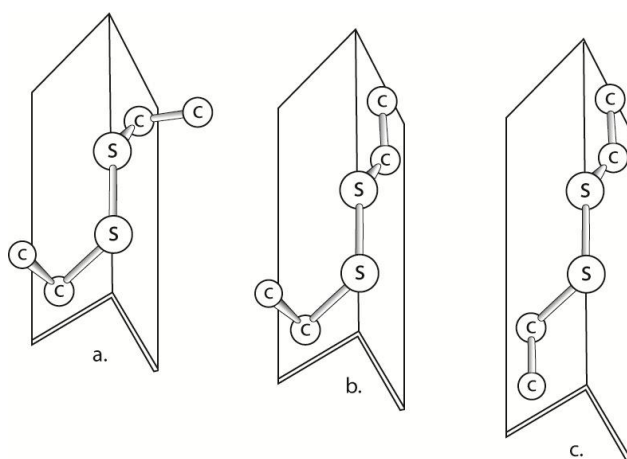


Figura 3.5 Dependencia de la frecuencia de estiramientos en la rotación interna. a) gauche-gauche-gauche; b) gauche-gauche-trans; c) trans-gauche-trans. Trans y gauche se refiere a los átomos del lado izquierdo. Fuente: Tu (1982).

El análisis de los cambios conformacionales en la Amida I (porcentaje de estructura secundaria), el grado de ocultamiento de los grupos triptófanos y tirosina y el tipo de vibración de enlace disulfuro permiten en conjunto evaluar los cambios conformacionales experimentados por las proteínas de gluten como consecuencia de su interacción con los diferentes hidrocoloides.

3.1.3.2 Electroforesis

Esta técnica permite separar y determinar las masas moleculares de proteínas disueltas en un extracto a partir de su movilidad en un gel de poliacrilamida, al ser sometidas a un campo eléctrico.

En las electroforesis SDS-PAGE se emplea dodecil sulfato de sodio (SDS) un detergente aniónico que tiene la particularidad de conferir densidad de carga uniforme a las proteínas lo que lleva a una separación de las fracciones proteicas por diferencia de masa. El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se orientan hacia el interior, mientras que los grupos sulfato lo hacen en la superficie por lo que todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa.

El tratamiento con un agente reductor de puentes disulfuro, como el beta-mercaptoetanol (β -ME) o el ditioneitol (DTT) desnatura las proteínas por disociación en subunidades o polipéptidos de menor tamaño molecular, que en la proteína original estaban unidas por uniones disulfuro.

La separación de las subunidades de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970), visualizándose su ubicación mediante la tinción con colorante Coomassie Blue. Las bandas obtenidas son comparadas con un patrón compuesto por un conjunto de proteínas de masa molecular conocida, las cuales se someten al mismo tratamiento.

De acuerdo a lo descrito en la Introducción (sección 2.2) las proteínas formadoras del gluten se pueden clasificar en distintas subfracciones que

poseen diferente movilidad electroforética. En la Figura 3.6 se observa un esquema de la ubicación relativa de las distintas subunidades en geles de lactato y SDS-PAGE:

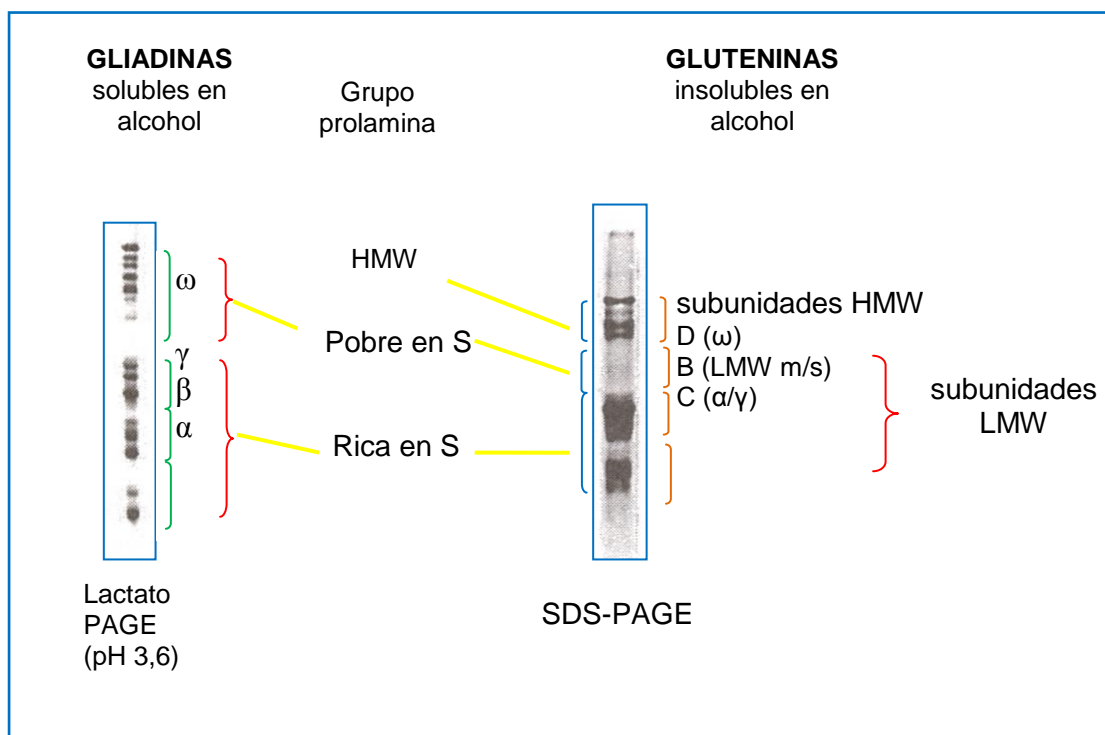


Figura 3.6 Esquema de clasificación de las proteínas de gluten de trigo separadas por electroforesis SDS-PAGE y a pH ácido. Adaptado de Shewry (2003).

La técnica de SDS-PAGE ha sido aplicada en numerosos trabajos para determinar el perfil proteico del trigo y en particular, poder relacionar el mismo con la aptitud para producir una masa panaria de adecuadas características (Rogers y col. 1989, Lindsay y Skerritt. 1999, Shewry y col. 2001). Además esta metodología ha sido utilizada con éxito para dilucidar el carácter de las interacciones entre proteínas de trigo y otras de distinto origen, como las de soja (Ribotta y col. 2005).

En el presente trabajo, el análisis de las proteínas de gluten por SDS-PAGE se aplicó para evaluar la influencia de los hidrocoloides en los cambios de la matriz de gluten a través del tipo y/o cantidad de gliadinas y gluteninas que pueden ser solubilizadas a partir de dicha matriz.

Los objetivos de este capítulo fueron: a) aplicar distintas técnicas químicas y físicas para caracterizar el tipo de interacción entre los hidrocoloides y los componentes principales de la masa: proteína, almidón y agua; b) comparar el efecto de diferentes hidrocoloides sobre dichos componentes.

3.2 Materiales

3.2.1 Preparación de la masa

Los estudios se realizaron utilizando la concentración máxima de hidrocoloide. Se prepararon masas según la siguiente formulación: cada 100 g de harina, 2g de NaCl, 1,5 g de hidrocoloide. Las características de la harina y los hidrocoloides utilizados para estos ensayos ya fueron especificadas en el Capítulo 2.

Las masas, como se mencionó en el Capítulo 2, se prepararon bajo dos condiciones de hidratación:

- con nivel constante de agua, correspondiente a la absorción farinográfica de la harina sin el agregado de hidrocoloide (control) (CONDICION 1)
- con el contenido de agua correspondiente a la absorción farinográfica obtenida para cada mezcla harina-hidrocoloide. (CONDICION 2)

Las masas fueron preparadas en la amasadora de un microfarinógrafo de Brabender con capacidad de 10 g de harina (Brabender, Alemania). El tiempo

de amasado fue ajustado teniendo en cuenta el tiempo de desarrollo farinográfico de cada masa (Tabla 2.4, Capítulo 2). La masa se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos cubierta con un film para evitar deshidratación. Para algunos ensayos se utilizó masa fresca y en otros casos fue necesaria una liofilización. Para la liofilización se utilizó un equipo Heto-FD4 (Heto-Holten, Dinamarca). Luego de liofilizadas, las muestras fueron guardadas en recipientes plásticos herméticos hasta su uso.

3.3 Metodologías

3.3.1 NMR: ensayos de relajación T_2

Se analizó la movilidad molecular de las matrices de las diferentes masas mediante ensayos de relajación ^1H spin-spin (T_2) con un equipo para Resonancia Magnética Nuclear Minispec (Bruker, EE.UU), utilizando la secuencia de Carr-Purcel-Meiboom-Gill.

Porciones de cada masa fresca fueron introducidas en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro hasta alcanzar una altura de muestra aproximada de 30 mm. Los tubos fueron colocados en la celda del equipo, obteniéndose las curvas de intensidad de señal en función del tiempo (curvas de relajación) a temperatura ambiente.

Las curvas se pueden modelar de acuerdo a expresiones exponenciales de uno ó más términos que representan a las poblaciones de diferentes movilidades moleculares:

$$I = \sum_{i=1}^n A_i e^{(-t/T_{2i})} \quad (3.1)$$

donde:

I : intensidad de señal de los protones, a un tiempo t

t : tiempo

T_{2i} : constante de tiempo de relajación para cada población

A_i : intensidad máxima para cada población de protones

Los ensayos se realizaron por duplicado de masa y se efectuaron cuatro mediciones en cada tubo, cambiando la orientación mediante rotaciones de 90° sobre su eje.

3.3.2 Ensayos de calorimetría diferencial de barrido

Para los ensayos de calorimetría diferencial de barrido se utilizó un calorímetro Q100 (TA Instruments, EE.UU) provisto de dispositivo de enfriamiento con N_2 líquido. Para la calibración del equipo se utilizó un patrón de Indio. El análisis de los termogramas fue realizado con el software provisto con el equipo, TA Universal Analysis (EEUU).

Se colocaron pequeñas cantidades de muestra (10-14 mg) pesadas en la precisión de 0,00001 mg en cápsulas de aluminio que luego se sellaron herméticamente. Las cápsulas se colocaron en la celda del equipo junto a una cápsula vacía utilizada como referencia. Se realizaron tres tipos de ensayos cuyos protocolos se describen a continuación.

3.3.2.1 Determinación de agua congelable y temperaturas de transición vítrea

En estos ensayos se congelaron las muestras a una temperatura cercana a los -40°C para obtener la entalpía de fusión del hielo y luego determinar a partir de ella, la cantidad de agua congelable. Las muestras se equilibraron dentro de la celda del equipo a 20°C durante 5 minutos. Luego fueron congeladas a una

velocidad de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y templadas a -40°C por una hora para obtener masas con una concentración máxima de solutos en la matriz no congelada. En este tipo de ensayos la temperatura de templado elegida se localiza ligeramente por debajo del valor de T_g . Posteriormente, las muestras fueron calentadas a velocidad constante de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar los 20°C , registrándose en esta etapa la endoterma de fusión del hielo.

Del área de los termogramas, se determinaron las entalpías involucradas en la transición y la cantidad de hielo fue calculada a través de la constante de fusión del hielo (333 J/g). El agua total fue determinada por deshidratación a 105°C . El agua congelable se informó como un porcentaje del total de acuerdo a la ec. 3.2

$$\% \text{ agua congelable} = \frac{\Delta H_{\text{fusiónhielo}}}{333 \text{ J / g}} \times 100 \quad (3.2)$$

Las temperaturas asociadas a la transición vítrea (inicial y final) fueron calculadas a través del programa del equipo en la región donde se produjo el cambio en la línea de base del termograma. Los ensayos se realizaron al menos por cuadruplicado.

3.3.2.2 Gelatinización del almidón

Las muestras con hidratación adaptada (CONDICION 2) se sometieron a un calentamiento programado desde 20°C a 130°C a una velocidad de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Adicionalmente, para ver si en condiciones de hidratación restringida se observaba un efecto sobre las temperaturas y la entalpía de gelatinización, una serie de muestras de masa fresca preparadas en esta condición de hidratación (CONDICION 1) se liofilizaron y luego se rehidrataron hasta un valor constante e igual en todos los casos ($0,5 \text{ g de agua /g de sólido}$ o $0,2 \text{ g de agua /g de sólido}$). La masa liofilizada se rehidrató en un eppendorff, se mezcló con una

espátula durante 1 minuto y luego se dejó en equilibrio durante 1 hora. Alícuotas de alrededor de 10 mg se encapsularon y se corrieron con el protocolo descrito.

De los termogramas se obtuvieron la temperatura inicial (T_i), de picos (TPI y TPII) y temperatura final (T_f) y las entalpías de gelatinización (ΔH gelatinización). Se realizaron cuadruplicados de los ensayos.

3.3.2.3 Interacción proteínas de gluten-hidrocoloide

3.3.2.3.1 Análisis por calorimetría diferencial de barrido

A. Extracción secuencial de las proteínas de gluten

La extracción de proteínas se realizó bajo un procedimiento secuencial del tipo Osborne (Osborne, 1957) a partir de 20 g de masas sin hidrocoloide liofilizadas, preparadas según lo descrito en el ítem 3.2.1 utilizando 100 ml de cada solvente (Puppo y col. 2005).

Se emplearon las siguientes soluciones:

- 1) NaCl 0,15M para albúminas y globulinas
- 2) 1-propanol 50% para gliadinas
- 3) ácido acético 0,1M para gluteninas

Cada etapa de extracción incluyó 30 minutos de agitación continua, seguidos por centrifugación a 1000 xg durante 10 minutos. Luego de cada extracción el residuo fue lavado con las respectivas soluciones, descartando el sobrenadante. Los extractos de 1-propanol y de ácido acético se liofilizaron y almacenaron en envases herméticos hasta el momento de su uso.

B. Condiciones del ensayo

Los ensayos se realizaron en un calorímetro Q100 (TA Instruments), utilizando una cápsula vacía como referencia. Se pesaron alrededor de 10 mg de una mezcla proteína:hidrocoloide:agua. Esta mezcla se preparó pesando

cantidades de gliadina o glutenina liofilizada, hidrocoloide y agua de modo de lograr una relación 1:1:2. Las cápsulas se sellaron herméticamente y se calentaron a 10°C/min de 20 a 120°C. Se analizó el efecto de los hidrocoloides en las propiedades térmicas de gliadinas y gluteninas.

3.3.3 Espectroscopía FT- Raman

3.3.3.1 Obtención del gluten

La obtención del gluten se realizó a partir de las masas preparadas con los distintos hidrocoloides en concentración de 1,5% (base 100 g de harina). Para este ensayo se utilizó un equipo Glutomatic (Glutomatic, EE.UU). Se modificó el protocolo usual para la determinación de gluten (38-12A, AACC, 2000) de modo de que las masas hubieran alcanzado su óptimo desarrollo. Las masas preparadas en la amasadora del farinógrafo utilizando condiciones óptimas, se colocaron en el recipiente del Glutomatic y fueron amasadas durante 60 segundos adicionales antes de ser sometidas al lavado con agua a 25 °C por 5 minutos. El gluten obtenido se liofilizó en un equipo Heto-FD4 (Heto-Holten, Dinamarca), se pulverizó con un molinillo KG30 (Delonghi, Italia) y se guardó en envases herméticos hasta el momento de su uso. Las muestras fueron identificadas como: gluten, gluten-GG, gluten-GX, gluten-P, gluten-LBG según el hidrocoloide utilizado.

3.3.3.2 Obtención de los espectros

Los espectros Raman fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro Bruker IFS 113 FT-IR (Bruker Optics, Alemania) provisto con el accesorio NIR Raman equipado con láser Nd:YAG a 1064 nm. La calibración de la frecuencia del instrumento se realizó usando la línea de sulfuro a 217 cm⁻¹. El espectro fue

registrado con una potencia láser de 500 mW y una resolución espectral de 6 cm^{-1} a temperatura ambiente. Cada espectro fue obtenido a partir de un promedio de 1000 escaneos con el objeto de lograr una relación señal/ruido alta. Los espectros FT-Raman fueron graficados como intensidad (unidades arbitrarias) en función del desplazamiento de número de onda (cm^{-1}). Todos los espectros fueron normalizados en todo el rango (4000–500 cm^{-1}). El graficado, procesamiento, normalización, manipulación y evaluación de los espectros se realizó a través del software OPUS (Bruker Optics, Alemania). Las intensidades de las bandas fueron calculadas luego de una corrección de la base de línea realizada con un método de integración desarrollado dentro del software OPUS. Los valores de intensidades obtenidos para el doblete tirosina se calcularon en relación a la línea de base local de cada pico (830 y 850 cm^{-1}). La asignación de bandas de los mayores movimientos de vibración de las cadenas laterales o de la cadena principal peptídica fue basada en la comparación de los datos Raman informados en la literatura (Tu 1982; Yu y col. 1973, Lord y col. 1970; Sugeta y col. 1970). Todos los análisis fueron realizados en tres experimentos independientes y los resultados se expresaron como promedio entre estos replicados. No fue posible realizar un buen espectro Raman para el sistema gluten-LBG+GX por esta razón los datos obtenidos no fueron incluidos.

3.3.4 Perfiles electroforéticos de los extractos proteicos obtenidos de masas con hidrocoloide

3.3.4.1 Extracción de las diferentes fracciones proteicas

La extracción de proteínas se realizó a partir de las masas liofilizadas preparadas según el ítem 3.2.1. Se utilizaron dos métodos de extracción secuencial, cada uno de ellos bajo diferentes condiciones:

3.3.4.1.1 Método estandarizado para harinas

Se siguió el protocolo de Singh y col. (1991), modificado por Nieto-Taladriz y col. (1997). Se emplearon como soluciones para la extracción:

Solución A: 1-propanol 50% (v/v)

Solución B: 1-propanol 50% (v/v) conteniendo Tris-HCl buffer 0,08M (pH 8,0)

Gliadinas: la extracción de las gliadinas se realizó a partir de 20 mg de masa liofilizada colocados en un microtubo al que se agregó 0,5 ml de solución A, luego se calentó a 65 °C durante 30 minutos agitando cada 10 minutos y se centrifugó durante 2 minutos a 9300 xg. El sobrenadante fue recogido y secado en estufa a 60 °C y posteriormente utilizado para la caracterización de las gliadinas por SDS-PAGE.

El residuo remanente fue lavado dos veces con solución A, descartando el sobrenadante.

Gluteninas: la extracción de gluteninas se realizó agregando al residuo remanente de la extracción de gliadinas una mezcla de la solución B con ditioneitol (DTT) 1% (p/v), preparada inmediatamente antes de usar. Se agregó 0,1 ml de esta mezcla y se incubó durante 30 minutos a 65 °C. Luego se centrifugó durante 5 minutos a 15600 xg. Sin descartar el sobrenadante se agregó 0,1 ml de la mezcla de solución B con 4-vinil-piridina 1,4% (v/v). Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 65 °C y centrifugadas 2 minutos a 15600 xg. El sobrenadante fue transferido a otro microtubo conteniendo 0,1 ml de solución C. Las muestras fueron incubadas 15 minutos a 65 °C y centrifugadas a 15600 xg. El sobrenadante fue utilizado para la caracterización de las gluteninas por SDS-PAGE.

Partes iguales (100 µl) de sobrenadante y buffer de muestra fueron colocados en un eppendorff, la suspensión fue homogeneizada al momento de la siembra. Se utilizó como buffer de muestra Tris-HCl 0,08M (pH 8,0), SDS 2% (p/v), glicerol 40% (p/v) y azul de bromofenol 0,02% (p/v).

3.3.4.1.2 Método secuencial de Osborne

La extracción se realizó como fue descripto para obtener las muestras para calorimetría diferencial de barrido (ítem 3.3.2.3.1).

Se suspendieron 8 mg de cada extracto liofilizado de masa en 2 ml de solución buffer compuesta por Trisma base 0,37M, glicerol 25 % (p/v), SDS 4 % (p/v) y azul de bromofenol 0,1% (p/v). Esta suspensión se sembró directamente en cada calle.

3.3.4.2 Separación e Identificación de las subunidades de proteínas por SDS-PAGE

Para la separación de las proteínas se utilizaron geles de poliacrilamida (9 y 12 %) de 1 mm de espesor. Se sembraron 20 μ l de solución por calle del gel.

Las corridas fueron realizadas en un equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories, EE.UU). El buffer de corrida se preparó a partir de glicina 0,192 M, Trisma base 0,025M y SDS 0,1 %, pH 8,3. Los geles fueron coloreados durante 24 horas con agitación constante en una solución acuosa conteniendo ácido acético (16%), metanol (40%) y Coomassie Blue R (2%). Para la decoloración se utilizó la misma solución sin el agregado de Coomassie Blue. Finalmente los geles se conservaron en agua destilada.

Para asignar las masas moleculares se utilizaron patrones de bajo peso molecular (Amersham, GE, EE.UU) los cuales contienen las siguientes proteínas: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). La masa molecular de las subunidades se determinó con el software Sigma-Gel (Jandel Scientific – Versión 1.0-1994-1995).

3.3.5 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA. Se utilizó el test de Tukey para la comparación de medias a un nivel de significación del 0,5% ($P < 0,05$). Para este análisis se utilizó el software Systat 10.2 (Systat Inc. 2002, EE.UU.).

3.4 Resultados

3.4.1 Efecto de los hidrocoloides en la movilidad molecular. Ensayos de relajación ^1H -RMN

En la Figura 3.7 se observa una curva de relajación típica obtenida para masa de harina de trigo. En general, las curvas de relajación se pueden modelar con ecuaciones de uno, dos o más términos exponenciales, donde los diferentes tiempos de relajación de cada término (T_{21} , T_{22} , T_{23} , etc.) están asociados a poblaciones de moléculas de diferente movilidad. Las especies con tiempos de relajación cortos son menos móviles (estado tipo sólido) que aquellas con tiempo de relajación más largos (estado tipo líquido).

La señal de spin a $t=0$ es proporcional al número de núcleos de hidrógeno para cada especie.

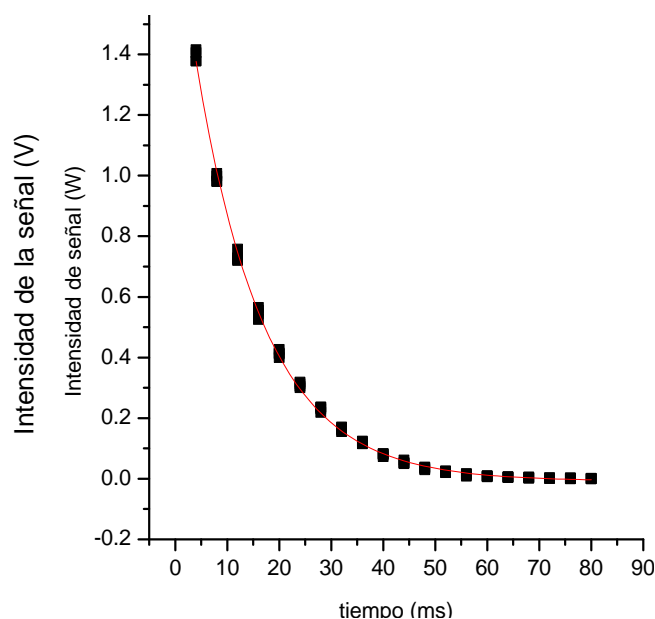


Figura 3.7 Curva de relajación típica para masa de harina de trigo.

En este trabajo, no pudieron diferenciarse poblaciones moleculares con diferentes movilidades, por lo que las curvas de decaimiento fueron modeladas a través de una ecuación exponencial de un sólo término.

Leung y col. (1976) investigaron diferentes sistemas basados en almidón de maíz, pectina, caseína y alginato de sodio. Sólo en el caso de almidón de maíz fueron encontradas dos poblaciones diferentes (con distinta movilidad); los otros sistemas mostraron un decaimiento monoexponencial. Estos autores atribuyeron este hecho a la dificultad de detectar un comportamiento de relajación multiexponencial dependiendo del sistema bajo estudio. Si el tipo de intercambio entre fases (agua ligada-agua móvil) es rápido comparado con el rango de relajación o si una fase está presente como una pequeña parte o uno de los tiempos de relajación es muy corto o ambos tiempos de relajación son similares, la precisión del instrumento no podría ser suficiente para detectar el comportamiento de fases múltiples. Leung y col. (1979) informaron un decaimiento exponencial doble para las masas, y atribuyeron este

comportamiento a dos fracciones de agua de movilidad diferente, aunque otros autores (López Da Silva y col. 2007), han aplicado un decaimiento exponencial simple para el modelado de las curvas de relajación de RMN para la masa.

La relajación del sistema está vinculada a las características de la red de gluten. Esselink y col. (2003) informaron que tiempos más largos de amasado conducían a una red de gluten con una estructura filamentosa, que se relacionaba con mayores valores de constante de relajación. La movilidad más alta de este tipo de estructura fue atribuida a la liberación de agua debido a la disrupción parcial de la red de gluten. Estos autores también encontraron que los tiempos de relajación disminuían después del moldeado de la masa, probablemente porque el estiramiento y orientación del gluten en esta etapa conllevaba a una red más ordenada y menos móvil.

En la Tabla 3.1 se muestran los valores obtenidos para las constantes de tiempo de relajación, T_2 , que van desde 11,5 ms a 14,5 ms. A través del ANOVA se encontró un efecto significativo ($p < 0,05$) del agregado de hidrocoloide.

Tabla 3.1 Movilidad molecular de masas con 1,5% de hidrocoloide

Muestra	T ₂ (ms)	
	Hidratación constante CONDICION 1	Hidratación adaptada CONDICION 2
C	12,9 a (0,3)	12,9 bc (0,3)
GX	13,0 a (0,8)	14,5 a (0,3)
GG	12,4 ab (0,3)	12,4 cd (0,4)
PE	11,6 b (0,2)	11,5 d (0,7)
LBG	12,7 a (0,3)	13,8 ab (0,5)
LBG+GX	13,4 a (0,3)	14,5 a (0,1)

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Entre paréntesis se expresa la DE

Cuando se prepararon masas con un nivel de hidratación constante (agregando cantidad de agua farinográfica correspondiente a la masa control, 60,2%, CONDICION 1) y se compararon las muestras con hidrocoloide respecto al control sin hidrocoloide no se observaron diferencias significativas en el tiempo de relajación excepto para la muestra con PE la cual exhibió un valor significativamente más bajo ($p < 0,05$).

Bajo la CONDICION 2 (hidratación adaptada) las masas con agregado de GX y LBG+GX mostraron un incremento significativo ($P < 0,05$) en el tiempo de relajación respecto al control, que se relaciona con un aumento de la movilidad

molecular. No se observaron diferencias significativas comparando con el control cuando se agregó GG o LBG. Con PE se produjo una disminución significativa en el tiempo de relajación, indicando una baja movilidad molecular. Comparando con las muestras con hidratación restringida (CONDICION 1) se obtuvieron tiempos de relajación significativamente ($P < 0,05$) más altos con GX, LBG y LBG+GX. Esto significaría que con agua adaptada, la matriz está menos estructurada y el agua más móvil.

De lo anterior, se desprende que las muestras con PE mostraron valores de T_2 similares en ambas condiciones de hidratación. Esto sugiere que la pectina es capaz de interaccionar con la red de gluten generando matrices con menor movilidad (lo que está indicado por los bajos valores de T_2) con cierta independencia del contenido de agua. La interacción PE-gluten sería a través de uniones puente hidrógeno de los grupos carboxilo o uniones hidrofóbicas de los grupos metilo. La menor movilidad del agua en las masas con pectina podría también explicar la menor adhesividad hallada en los ensayos texturales, ya que el agua al estar menos móvil no migraría a la superficie tan fácilmente.

Lusse y Arnold, (1998) estudiaron el fenómeno de relajación en soluciones de polisacáridos y atribuyeron las diferencias observadas en la velocidad de relajación del agua ligada ($1/T_2$) a procesos de reorientación con respecto al sitio de unión y a la movilidad de la cadena principal del polímero. Las soluciones de polímeros de cadena rígida exhibieron velocidades de relajación más altas (menores tiempos de relajación, o sea menor movilidad) que las soluciones de polímeros flexibles. López-Da-silva y col. (2007) caracterizaron masas de dos variedades de trigo que diferían en la dureza del grano y la capacidad de absorción de agua. La masa obtenida a partir de la variedad dura mostró una mayor movilidad molecular que aquella formada a partir de la variedad blanda. Estas movilidades diferentes de las matrices proteína/agua en masas de diferentes harinas fueron atribuidas por los autores a diferencias en la rigidez de la red.

Estos resultados estarían indicando que la conformación final y sobre todo, la flexibilidad de la matriz gluten-hidrocoloide-agua determinan el grado de unión del agua y su movilidad. Por lo tanto, si la conformación espacial de la proteína es modificada por la presencia de hidrocoloides, se obtendrán matrices diferentes, con distinto grado de flexibilidad y diferente capacidad para retener agua.

3.4.2 Agua congelable

Un parámetro usualmente usado para evaluar el grado de agua ligada es la cantidad de agua congelable (Herrera y col., 2007) respecto al total de agua de la muestra. El porcentaje de agua total para masas frescas hechas con hidratación adaptada (CONDICION 2) osciló desde 45 hasta 50% y desde 46 hasta 48% para las muestras con hidratación constante (CONDICION 1).

Los valores de porcentaje de agua congelable se muestran en la Tabla 3.2, para masas hechas con las dos condiciones. El análisis ANOVA indicó que hubo un efecto significativo en la adición de hidrocoloides ($P < 0,05$).

Para muestras con hidratación adaptada (CONDICION 2) se observó que el porcentaje de agua congelable aumentó significativamente ($P < 0,05$) sólo en el caso de LBG+GX (63,0 %), aunque también la muestra con GX mostró valores altos (61,2 %) aunque no significativamente diferentes al control. Estas dos muestras fueron las que tuvieron tiempos de relajación más altos, relacionados con una mayor movilidad molecular. Para las otras muestras (GG, PE y LBG), la disponibilidad de agua para el proceso de congelación fue similar en todos los casos (58,1%-60,3%).

En las masas con hidrocoloide preparadas en condiciones de hidratación constante (CONDICION 1), se esperaría una restricción en la disponibilidad de agua para la congelación debido al fuerte carácter hidrofílico de estas moléculas. Sin embargo, se observó en todos los casos (excepto en las muestras con PE) que los porcentajes de agua congelable resultaron

significativamente mayores ($P < 0,05$) que los valores obtenidos para la muestra control. También se observó una tendencia a mayores valores de agua congelable en comparación con las respectivas muestras sin restricción de agua.

Tabla 3.2 Agua congelable de las masas

	Agua congelable (%)	
muestra	Hidratación constante CONDICION 1	Hidratación adaptada CONDICION 2
C	59,4 c (1,2)	59,4 bc (1,2)
GX	62,0 b (0,6)	61,2 ab (0,9)
GG	64,9 a (1,5)	58,1 c (1,3)
PE	60,1 c (0,9)	59,3 bc (1,7)
LBG	62,7 ab (0,9)	60,3 b (1,5)
LBG+GX	62,6 b (0,7)	63,0 a (1,3)

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Entre paréntesis se expresa la DE

Este hecho parece contradictorio respecto a la baja movilidad molecular observada en las muestras preparadas con agua constante. Sin embargo, la movilidad parecería estar también vinculada al grado de rigidez de la red.

Campos y col., (1997) informaron que las masas no desarrolladas suficientemente durante el amasado presentaban una estructura rígida. Por lo tanto, cuando se impone una restricción de agua durante el desarrollo de la masa, se podría esperar una conformación diferente, más rígida de la matriz gluten-hidrocoloide-agua. Al mismo tiempo estas matrices podrían retener agua de una manera menos firme, que estaría disponible para la congelación, aumentando de este modo el porcentaje de agua congelable.

Respecto a la temperatura de transición vítrea de la matriz de máxima concentración de solutos (T_g') que contiene el agua ligada (no congelable), ambas muestras control (en condiciones de agua adaptada y restringida) mostraron una temperatura inicial de transición vítrea inicial (T_g^i) de $-34,4^{\circ}\text{C}$ y una temperatura final de transición vítrea (T_g^f) de $-32,1^{\circ}\text{C}$. La adición de hidrocoloides no afectó significativamente estas temperaturas respecto al control en la mayoría de los casos (datos no mostrados).

3.4.3 Efecto de los hidrocoloides en la gelatinización del almidón

La gelatinización del almidón puede ser definida como una fusión cristalina inducida por el solvente (agua) y el calentamiento, restringida por limitaciones cinéticas (Biliaderis, 1991). El primer paso para esta transición de no equilibrio es la difusión del agua que plastifica las regiones amorfas de los gránulos de almidón previamente a la fusión de las zonas cristalinas. Luego continúa el hinchamiento de los gránulos debido a la hidratación de los polímeros desordenados (Marchant y col. 1978; Slade y Levine, 1991).

En la Figura 3.8 se observan los termogramas típicos correspondientes a las distintas muestras con hidrocoloide en condiciones de hidratación adaptada. Se observa en todos los casos el desdoblamiento típico del termograma en dos picos (TPI y TPII) lo cual es característico en sistemas de almidón con restricción de agua (Biliaderis, 1992). Este desdoblamiento ha sido interpretado en forma diferente por diversos autores. Evans y Haisman, (1982) han sugerido

que la primera endoterma resulta de la fusión de los cristales menos estables lo que deja menos agua disponible para que ocurra la fusión de los remanentes y esto aumenta la temperatura de fusión.

Biliaderis y col. (1986) estudiaron sistemas de almidón de arroz con 50% de agua y sugirieron que a bajas velocidades de calentamiento se produce un incremento de la movilidad molecular al inicio de la primera endoterma; al haber mayor movilidad ocurriría un reordenamiento de las cadenas que aproximaría el sistema a un nuevo equilibrio por lo que son menos los cristales capaces de fundir a baja temperatura. Esto explica la aparición de una segunda endoterma correspondiente a cristales más estables, que funden a mayor temperatura.

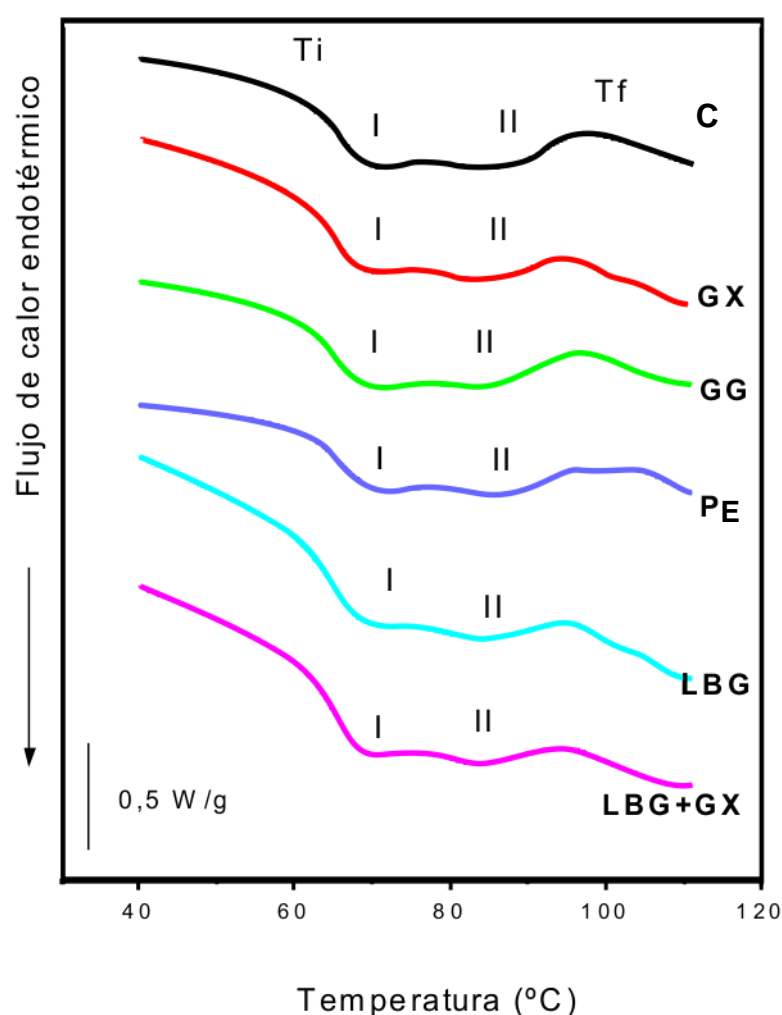


Figura 3.8 Termogramas obtenidos de las masas preparadas bajo condiciones de hidratación adaptada Concentración de goma 1,5%.

Como se desprende de la Figura 3.8, el agregado de hidrocoloides no alteró el perfil característico de los termogramas, observándose en general una primera endoterma mayor que la segunda.

Las temperaturas características y entalpías correspondientes a la gelatinización del almidón de éstas se muestran en la Tabla 3.3.

Si bien las temperaturas resultaron superiores al rango esperado, que para almidón de trigo es de 52-66°C, hay que tener en cuenta que la presencia de NaCl produce un corrimiento de las temperaturas a valores más altos (Chungcharoen y Lund, 1987). Las temperaturas de gelatinización, T_i y T_{PI} no fueron significativamente afectadas por la adición de hidrocoloides. Sin embargo, la temperatura del segundo pico (T_{PII}) y particularmente la temperatura final (T_f) fueron significativamente afectadas ($P<0,05$), observándose para T_f un corrimiento a temperaturas más bajas respecto al control, excepto para la masa con GG. Una baja T_f indica que el agua está más disponible para el proceso de gelatinización, lo que está de acuerdo con la movilidad molecular más alta observada para la matriz de masa en muestras con hidrocoloides (Tabla 3.1). Un corrimiento de T_f a valores más altos sería esperable si hubiera una restricción de agua por causa del agregado de hidrocoloides como fuera observado en otros trabajos (Ferrero y col. 1996). Una posible explicación a la menor temperatura final observada es que en sistemas con proteínas fuertemente hidratables como son las de gluten, el hidrocoloide agregado compite por el agua con la proteína conduciendo a una distribución diferente de la misma. De este modo, la matriz obtenida presentaría agua más lábil, de mayor disponibilidad, lo que conduce a una menor T_f .

Respecto a las entalpías de gelatinización, se encontraron diferencias significativas ($P<0,05$) entre las muestras con GX y las muestras con LBG o LBG+GX pero no se hallaron diferencias respecto al control en ningún caso.

Estos resultados muestran que la presencia de hidrocoloides, en los niveles utilizados, no llega a restringir el proceso cuando la cantidad de agua es la óptima.

Tabla 3.3 Temperaturas y entalpías de gelatinización de masas con agua adaptada.

Muestra	Ti (°C)	TPI (°C)	TPII (°C)	Tf (°C)	ΔH (J/g)
C	60,7 a (0,54)	69,95 a (0,34)	87,66 a (0,38)	98,35 a (1,08)	5,08 ab (0,56)
GX	61,30 a (0,83)	69,32 a (1,04)	85,61 ab (1,78)	95,53 bc (1,10)	3,90 b (0,41)
GG	60,44 a (0,54)	69,90 a (0,48)	87,37 a (1,05)	97,53 ab (1,11)	4,48 ab (0,79)
PE	60,52 a (1,08)	70,29 a (0,31)	87,12 ab (0,52)	95,80 bc (0,38)	4,06 ab (0,41)
LBG	59,83a (0,79)	68,78 a (0,51)	84,32 b (1,64)	95,33 bc (0,39)	5,42 a (0,24)
LBG+GX	60,24 a (0,46)	69,46 a (0,15)	84,94 ab (1,97)	94,63 c (0,28)	5,40 a (0,39)

Diferentes letras dentro de una misma columna indican que los valores son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la DE

3.4.3.1 Efecto de la restricción de agua

La necesidad de agua para una gelatinización completa es un hecho bien estudiado. Evans y Haisman (1982), en sistemas a base de almidón de papa, establecieron un mínimo de 0,54 g de agua/g de almidón seco para alcanzar una actividad acuosa cercana a 1. Con contenidos menores de agua tanto las temperaturas iniciales como finales resultaron incrementadas, indicando una restricción. A contenidos de agua superiores, a 2g/g de almidón seco la temperatura final de gelatinización disminuyó con cantidades crecientes de

agua. El mínimo de agua necesaria para una gelatinización completa es generalmente de 60% (p/p) (Lund, 1984).

Para evaluar si efectivamente la restricción en la relación agua: sólidos produce un cambio en el perfil del termograma y en los valores de entalpía y temperaturas, se rehidrataron masas liofilizadas, en dos niveles: con una relación sólido: agua de 1/0,5 y con una relación más restrictiva de 1:0,2.

En la Figura 3.9 se muestran las endotermas obtenidas para una relación sólido: agua de 1:0,5. Se observa en primer lugar, que en presencia de hidrocoloides la segunda endoterma se ve incrementada respecto a la primera, salvo en el caso de la masa con PE. El cambio más notorio se observó en las muestras que contienen LBG y la mezcla de hidrocoloides LBG+GX, en la que la primera endoterma es casi inexistente y con un desplazamiento importante de la segunda endoterma a mayor temperatura..

Las curvas observadas en la Figura 3.9 sugieren que el comportamiento térmico de las masas es sumamente dependiente del contenido de agua, observándose en condiciones de restricción, una influencia marcada del tipo de hidrocoloide.

En la Tabla 3.4 se muestran las temperaturas y entalpías de gelatinización para las masas con agua restringida. De acuerdo a estos resultados, la T_i aumentó con respecto al control con el agregado de LBG. Con GG, LBG y LBG+GX aumentó significativamente la TPI mientras que las TPII lo hicieron con el agregado de GX, LBG y LBG+GX. La T_f resultó significativamente incrementada por GX, GG, LBG y LBG+GX. Este corrimiento de T_f a valores más altos indica un cierto grado de restricción en el proceso de gelatinización, que puede vincularse al menor grado de disponibilidad de agua. La excepción la constituye la muestra con PE, que no presenta diferencias significativas respecto al control.

Aun así, la entalpía total del proceso no presentó diferencias significativas respecto al control.

Las entalpías de gelatinización no mostraron diferencias significativas respecto al control pero las muestras con GG y LBG+GX fueron significativamente diferentes entre sí presentando las entalpías más baja y más alta respectivamente. Las masas rehidratadas con menor contenido de agua (1:0,2) dieron termogramas con picos poco distinguibles no pudiéndose determinar las temperaturas correspondientes (datos no mostrados).

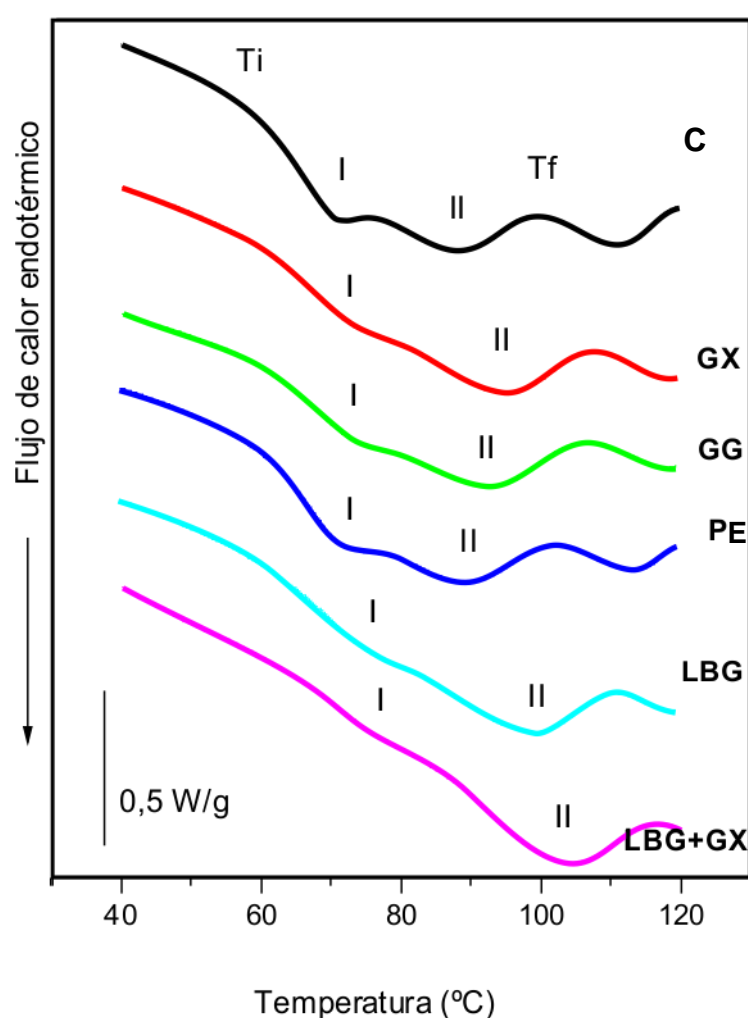


Figura 3.9 Termogramas obtenidos de masas rehidratadas a un nivel de agua:sólido 1:0,5. Concentración de goma 1,5%.

Tabla 3.4 Temperaturas y entalpías de gelatinización de masas con agua constante con relación agua:solido de 1:0,5.

Masa	Ti (°C)	TPI (°C)	TPII (°C)	Tf (°C)	ΔH (J/g)
C	59,4 a (1,5)	70,9 a (1,0)	89,5 a (0,6)	101,5 a (0,4)	5,5 ab (1,2)
GX	59,8 a (0,7)	72,6 ab (0,2)	95,7 b (0,2)	107,5 b (0,5)	5,7 ab (0,5)
GG	60,8 ab (1,5)	73,9 b (1,7)	92,9 ab (0,4)	105,9 b (1,2)	4,2 a (1,3)
PE	59,8 a (1,3)	72,3 ab (0,8)	92,6 ab (0,8)	104,5 ab (0,4)	5,5 ab (1,2)
LBG	62,0 b (1,5)	75,8 b (0,7)	100,8 c (1,5)	110,8 c (0,4)	6,2 b (1,7)
LBG+GX	61,7 ab (0,1)	76,3 b (0,4)	103,1 c (0,6)	113,9 c (1,0)	5,4 ab (1,1)

Diferentes letras dentro de una misma columna indican que los valores son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Entre paréntesis se expresa la DE.

Los resultados obtenidos en condiciones de restricción de agua indican que puede haber un efecto sobre la gelatinización del almidón en presencia de hidrocoloides cuando hay menor disponibilidad de agua pero dependiente del tipo de goma utilizada; en particular este efecto es más importante sobre las temperaturas que sobre la entalpía del proceso.

3.4.3 Efecto de los hidrocoloides en la estructura de las proteínas

3.4.3.1 Sistema glutenina-hidrocoloide: propiedades térmicas

La desnaturalización es la transición más importante que sufren las proteínas durante el proceso de panificación y que contribuye significativamente en las características del producto final (Falcão-Rodrigues y col. 2005).

Diversos autores han polemizado respecto a la dificultad de registrar las endotermas de desnaturalización de las proteínas de gluten. Eliasson y Larsson, (1993) han propuesto diferentes hipótesis para explicar la frecuente ausencia de endotermas en los termogramas: a) ausencia de una estructura ordenada en las proteínas del gluten, b) termoestabilidad c) ausencia de suficiente cooperatividad en el fenómeno que permita generar un flujo de calor detectable.

León y col. (2003) han estudiado la variación de las temperaturas de desnaturalización de las gluteninas en función del contenido de agua. Estos autores han informado que para una sistema con 4% p/p de agua, se registraron dos endotermas, a 64,3 y 84,2°C. A medida que el contenido de agua aumentaba se verificó la desaparición de la segunda endoterma y el desplazamiento de la primera endoterma a temperaturas menores (hasta localizarse a 40,9°C para 52,1% de agua). Falcão-Rodrigues y col. (2005) analizando muestras con 50% de humedad detectaron endotermas de desnaturalización pero no sucedió lo mismo a contenidos de humedad mayores o menores. Respecto a las transiciones de gluteninas solubles e insolubles, estos autores hallaron temperaturas de desnaturalización entre 37,3°C y 49,1°C para las solubles y de 43,5°C y 43,6°C para las insolubles, según la variedad de trigo. Eliasson y Heeg (1980) estudiaron las transiciones térmicas en gluten obtenido con Glutomatic y un contenido de humedad del 63% encontrando cuatro endotermas que asignaron al almidón residual (64,6°C y 111,8°C) y a desnaturalización del gluten (88,4°C y 101,4°C) y concluyen que las entalpías son tan pequeñas que indican que estas transiciones no son un factor importante a tener en cuenta en el proceso de panificación.

En el presente trabajo, se pudieron detectar endotermas en los sistemas con gluteninas y con gliadinas. En el caso de las gliadinas los picos no resultaron reproducibles. En los termogramas de las muestras con glutenina se

observaron ligeras diferencias en el perfil para una misma muestra entre replicados pero se pudieron determinar tendencias. Estas dificultades para analizar las transiciones térmicas de las proteínas de gluten se deben probablemente a la imposibilidad de reproducir exactamente las mismas condiciones de hidratación y formación del complejo entre una muestra y otra. En la Figura 3.10 se muestran los termogramas correspondientes a distintas mezclas glutenina:hidrocoloide:agua (1:1:4) y a glutenina:agua (1:2) (control, C), o sea muestras con un contenido de humedad de 66 % (p/p). La muestra control exhibió varios picos endotérmicos entre 50 y 120°C, destacándose los picos a 55 y a 110°C. Estos valores resultaron similares a los informados por Eliasson y Hegg (1980) y León y col. (2003).

Los termogramas resultaron modificados al agregar hidrocoloide, registrándose una menor cantidad de endotermas en el rango de temperaturas más bajas. Se destaca aun el pico a altas temperaturas (110°C) en los sistemas con GX o GG. En el caso de sistemas con PE se observó la aparición de una única endoterma amplia en el rango de 70 a 100°C, con un máximo alrededor de 90°C. Con LBG o LBG+X se observaron endotermas amplias entre 80 y 120°C. Diversos autores (Imeson y col., 1977, Ibanoglu, 2005; Ibanoglu y Ercelebi, 2007) han estudiado la interacción entre hidrocoloides y distintas proteínas a través de calorimetría diferencial de barrido, encontrando diferentes efectos.

Ibanoglu y Ercelebi (2007) informaron una disminución de la estabilidad (evidenciada por las menores temperaturas y entalpías de desnaturalización) en proteínas de clara y de yema de huevo en presencia de ι -carragenano, no así en presencia de pectina y guar. Estos autores atribuyen los resultados obtenidos a las uniones más fuertes que establecen los grupos cargados positivamente de las proteínas ($-\text{NH}_3^+$) con los grupos sulfato de los carragenanos. Si bien las pectinas también tienen grupos cargados negativamente (carboxilos) las uniones serían más débiles. Sin embargo, con otras proteínas globulares, Ibanoglu, (2005) encontró efectos diversos según la combinación proteína-hidrocoloide

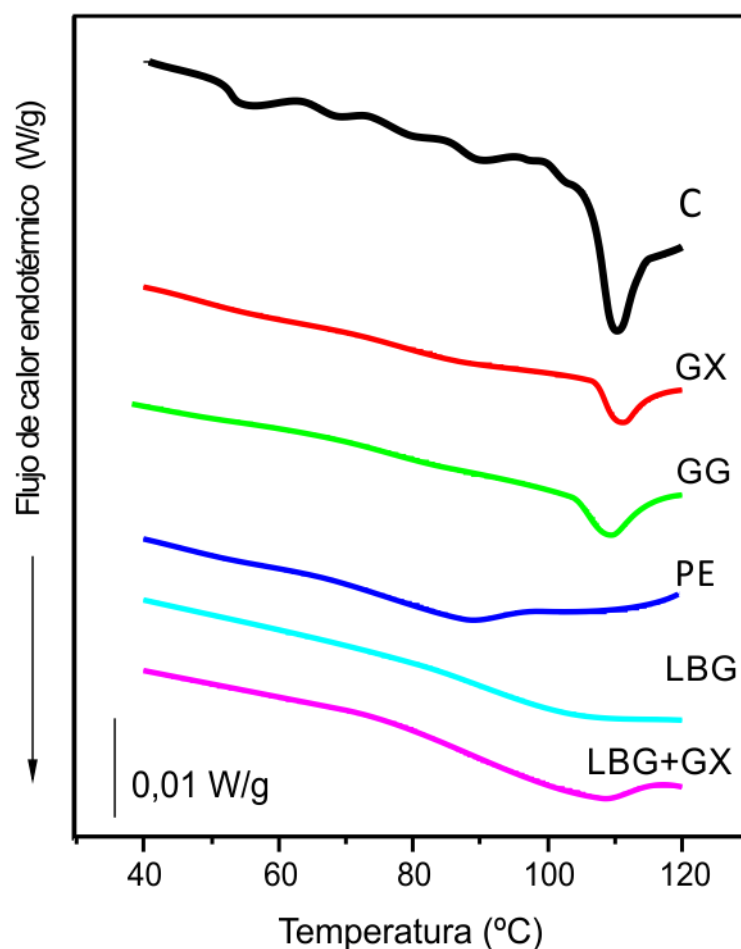


Figura 3.10 Termogramas obtenidos de las mezclas gluteninas:goma:agua (1:1:4).

En el caso de la lisozima, el agregado de ι -carragenano desestabilizó la proteína disminuyendo la temperatura y entalpía de desnaturalización. Con albúmina de suero bovino no se observaron cambios con ninguno de los hidrocoloides ensayados. La proteína de suero lácteo mostró una disminución de la entalpía de desnaturalización en todos los casos pero un aumento de la temperatura de desnaturalización.

Imeson y col., (1977) estudiaron el efecto de distintos hidrocoloides sobre el grado de desnaturalización térmica de mioglobina y albúmina de suero bovino.

Sobre la proteína nativa a pH 6 los hidrocoloides ensayados (pectato, alginato y CMC) solamente perturbaron la estructura causando disminución de la estabilidad térmica. La explicación de lo observado sería que a grados de desnaturalizaciones mayores, se formaron complejos electrostáticos más fuertes que inhibieron la agregación proteína-proteína.

Si bien los ensayos del presente capítulo sólo pudieron ser analizados cualitativamente, se podría afirmar que esta diferencia en los perfiles calorimétricos sugiere una diferente interacción glutenina:hidrocoloide. En el caso de la muestra con PE, se observó que el pico más destacado del termograma está desplazado a menores temperaturas en comparación con el resto de los casos. Esto indica que habría una interacción entre este hidrocoloide y las gluteninas que conduciría a una desestabilización de la estructura proteica y menores temperaturas de desnaturalización.

3.4.3.2 Cambios de estructura secundaria de proteínas de gluten

La estructura secundaria de los sistemas gluten-hidrocoloide fueron estudiados por técnicas de espectroscopia FT-Raman. En la Figura 3.11 se observa el espectro completo obtenido para el gluten control (sin hidrocoloide) donde se pueden apreciar las principales bandas analizadas.

3.4.3.2.1 Banda Amida I

Las bandas correspondientes a la Amida I y III pueden ser usadas para caracterizar la conformación de la cadena proteica principal. Las proteínas con conformación de α -hélice muestran una banda Amida I ubicada alrededor de $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ y otros picos a 1681 , 1674 , 1639 , 1630 y 1619 cm^{-1} correspondientes a las conformaciones hoja plegada β -antiparalela, giro β ,

estructura al azar, hélice solvatada, y hoja plegada β , respectivamente (Tu, 1982; Ferrer y col., 2008).

En la Figura 3.12 se observa un espectro Raman típico correspondiente a la región de la banda Amida I para las muestras de gluten y gluten-hidrocoloide. Como se puede apreciar la banda Amida I está ubicada a 1657 cm^{-1} ; estos resultados concuerdan con los datos informados previamente por otros autores (Wong y col., 2007) e indican que en la estructura secundaria predomina la conformación α -hélice.

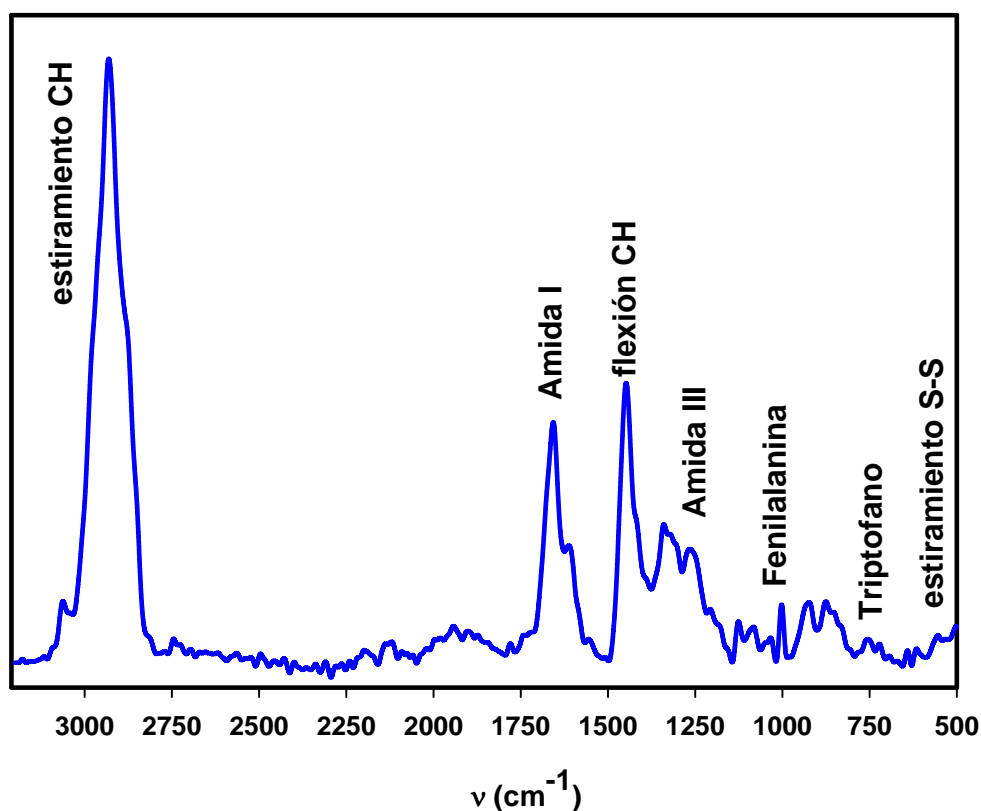


Figura 3.11 Espectro FT Raman típico de gluten de trigo.

Comparando los resultados de las muestras con hidrocoloide respecto al control sin goma se observó un incremento de la intensidad de la banda

asignada a la conformación α -hélice de la muestra gluten-LBG mientras que disminuyó la intensidad de esta banda para las muestras gluten-GG, gluten-PE y gluten-GX.

Estos resultados indican que la interacción de hidrocoloides con las proteínas de gluten afecta las uniones electrostáticas e hidrofóbicas puente hidrogeno, conduciendo a cambios en la conformación. Una mayor intensidad de la banda Amida I (con respecto a la correspondiente de gluten control) estaría relacionada con un incremento del plegamiento de la proteína, lo que sugiere cambios conformacionales que conducen a una estructura más ordenada (Ferrer y col. 2008).

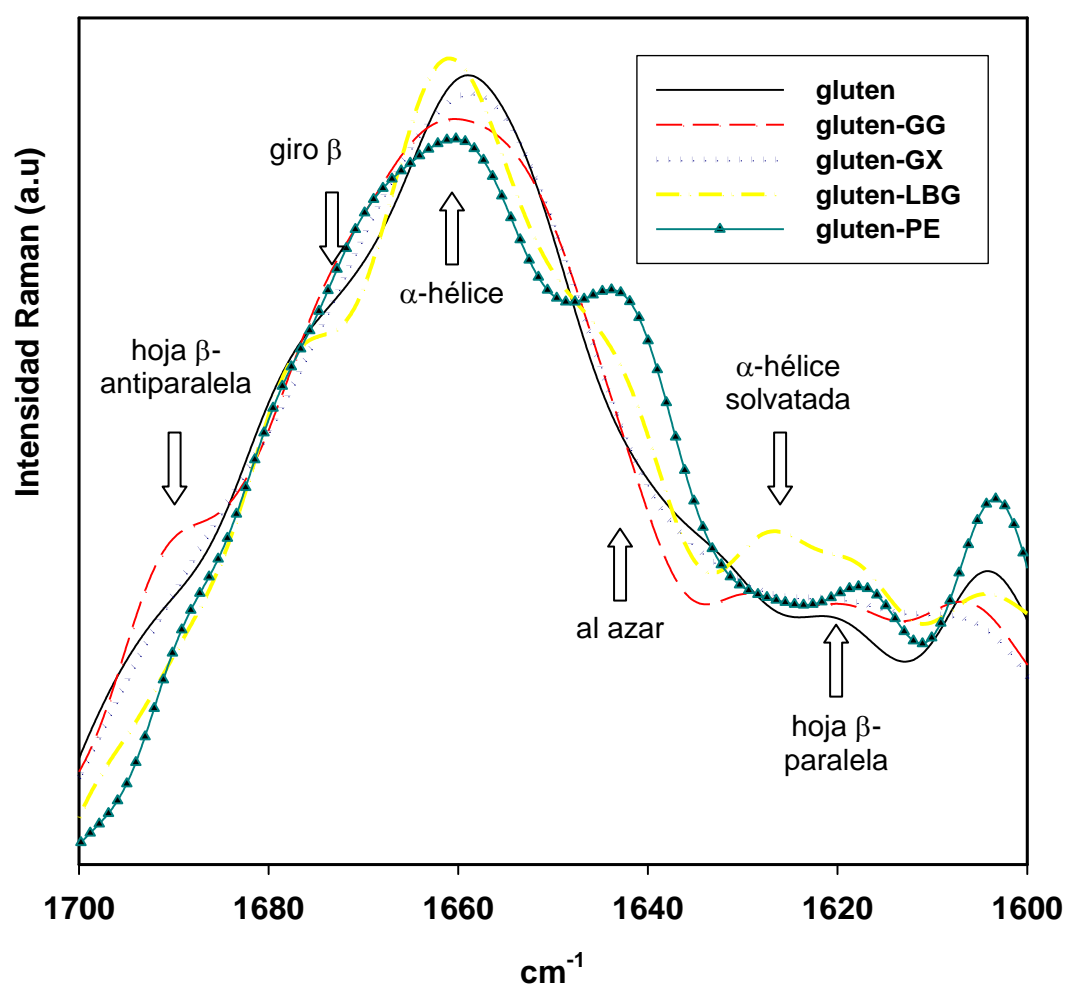


Figura 3.12 Bandas Amida I de las diferentes muestras de gluten con hidrocoloides obtenidas por FT- Raman.

En el sistema gluten-LBG el incremento en la intensidad de la banda α -hélice fue acompañado por una disminución en la intensidad de las bandas asignadas a las estructuras hoja plegada β -antiparalela (1681 cm^{-1}), giro β (1674 cm^{-1}) y un incremento en las bandas correspondientes a hoja plegada β (1619 cm^{-1}) y a hélice solvatada (1630 cm^{-1}). Por otro lado, una menor intensidad de la banda asignada a la conformación α -hélice para los sistemas gluten-GG, gluten-PE y gluten-GX, respecto al control, se puede relacionar con un cierto grado de desplegamiento de la cadena proteica. Este cambio estaría asociado a estructuras desordenadas y a conformaciones de tipo β , distintas en cada sistema hidrocoloide-gluten: en el sistema gluten-GG hubo un ligero aumento en la intensidad de las bandas relacionadas con hoja plegada β -antiparalela, giro β y hoja plegada β ; en el sistema gluten-PE se observó un incremento pronunciado en la intensidad de las bandas relacionadas con las conformaciones al azar, hélice solvatada y hoja plegada β ; en el sistema gluten-GX hubo un aumento en la intensidad de las bandas relacionadas con las conformaciones giro β , hélice solvatada y hoja plegada β .

Comparando los datos de DSC y agua congelable con los resultados de FT-Raman se puede observar que las muestras con la mayor movilidad y más agua congelable, como en el caso de masas con GX y LBG, también mostraron más intensidad de las bandas α -hélice en los ensayos de FT-Raman, mayor plegamiento y, en general, una estructura de gluten más ordenada aunque este orden, como se discutió al analizar los resultados de movilidad molecular (ensayos de relajación T2) no implica una mayor rigidez de la estructura.

Por otro lado en las masas con PE y GG, aunque se observó con los ensayos de relajación una menor movilidad molecular de la matriz, relacionada con una estructura más rígida, los espectros obtenidos indican que se trata de una estructura a la vez más desordenada o desplegada, particularmente por la baja intensidad de la banda α -hélice.

3.4.3.2.2 Análisis de vibración de las cadenas secundarias

A. Modo triptófano

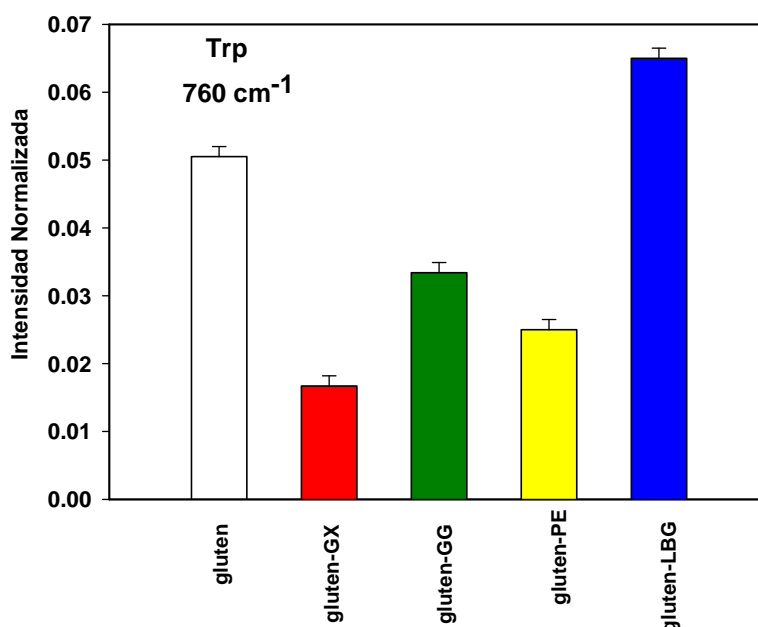


Figura 3.13 Intensidad FT-Raman normalizada de la banda triptófano (760 cm^{-1}) para las muestras de gluten. Las barras en las columnas indican desviación estándar.

La adición de hidrocoloide causó fuertes cambios en la intensidad normalizada de las bandas 760 cm^{-1} . En la Figura 3.13 es posible observar que GX fue el hidrocoloide que condujo a un mayor decrecimiento de la intensidad de esta banda, seguido por PE y GG. Estos resultados sugieren que el residuo indol pasa de un microentorno hidrofóbico oculto a estar expuesto y contribuir así a la formación de una estructura más desordenada. Por el contrario, en el caso de LBG-gluten se obtuvo un incremento en esta banda lo que sugiere un mayor ocultamiento del residuo triptófano en la proteína por efecto de LBG y por ende la formación de una estructura proteica más ordenada; coincidente con el mayor porcentaje de estructura α -hélice.

B. Doblete tirosina

En la Figura 3.14 se observa la relación de intensidad de las bandas correspondientes a 850 y 830 cm^{-1} pertenecientes a las vibraciones de tirosina $I_{850/830}$ para las distintas muestras de gluten con hidrocoloide. Los cambios detectados indicaron que los microentornos de los grupos tirosilo fueron alterados en gran medida por la interacción de los hidrocoloides con las proteínas del gluten. Para los sistemas gluten-GG y gluten-GX hubo una disminución en la relación $I_{850/830}$ en comparación con el gluten control. Este comportamiento estaría indicando que los residuos tirosina quedaron ocultos. Por otro lado, se observó un ligero aumento de la relación $I_{850/830}$ para gluten-PE y un gran incremento en el caso de gluten-LBG, lo que sugiere una exposición del tirosilo debido a la interacción con los hidrocoloides.

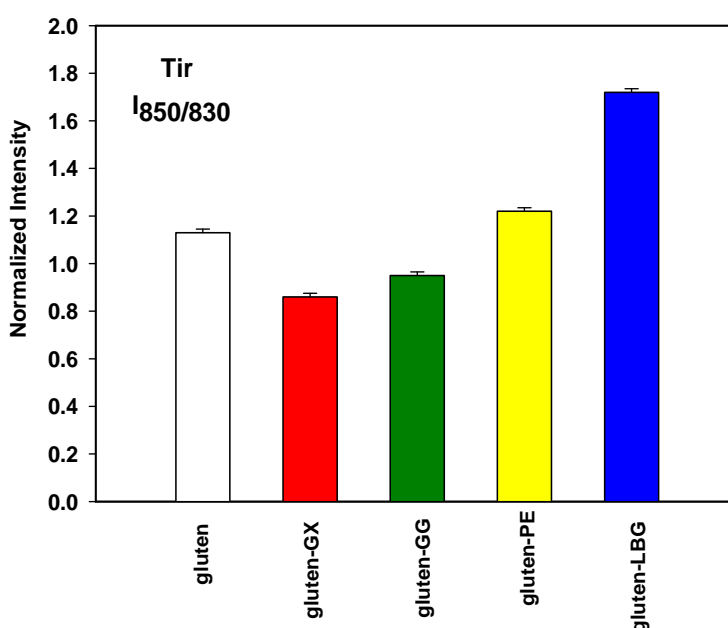


Figura 3.14 Relación de intensidades FT-Raman normalizada de las bandas tirosina ($I_{850/830}$) para las muestras de gluten. Las barras en las columnas indican desviación estándar.

C. Vibración del enlace disulfuro

En la Figura 3.15 se observan las intensidades normalizadas para las bandas correspondientes al estiramiento de los diferentes rotámeros de puente disulfuro correspondientes a las muestras de gluten y gluten con hidrocoloide. En el gluten control las bandas asociadas a este modo de vibración están localizadas a 534 cm^{-1} (rotámero t-g-t) y a 515 cm^{-1} (rotámero g-g-g), respectivamente. La banda más intensa en el gluten control fue para la conformación g-g-g.

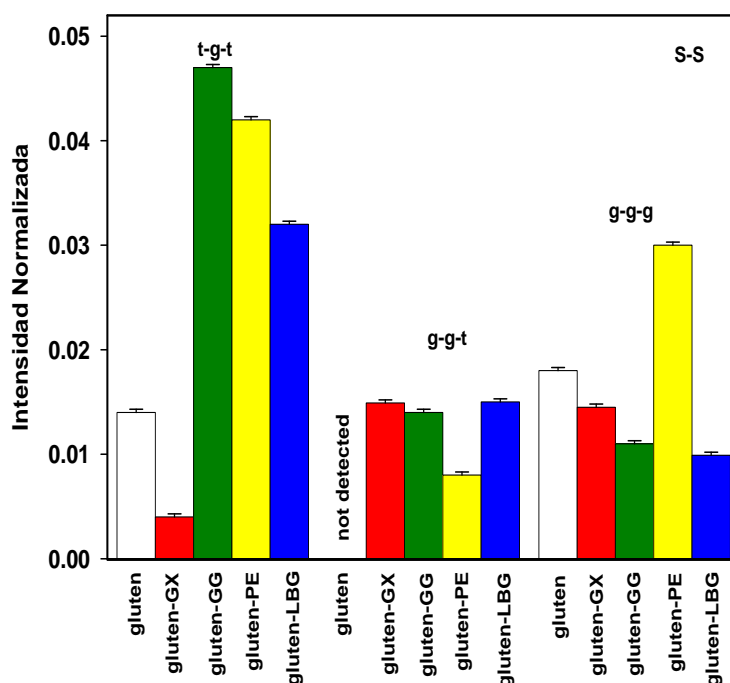


Figura 3.15 Intensidad FT-Raman normalizada de la vibración de estiramiento Raman S-S en la región $470\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ para las muestras de gluten. Las barras en las columnas indican desviación estándar.

En las muestras con hidrocoloideos se detectaron cambios en la intensidad respecto al control. La conformación g-g-g disminuyó su intensidad relativa en todos los casos excepto en el sistema gluten-PE. La conformación g-g-t estuvo ausente en el gluten control pero apareció en los sistemas con hidrocoloideos, con una menor intensidad en el sistema gluten-PE. Al agregar hidrocoloide al

sistema, la intensidad relativa se incrementó fuertemente respecto al control para el rotámero t-g-t excepto para el sistema gluten-GX.

Estos resultados sugieren que la conformación de los enlaces disulfuro se modificó en gran medida con la adición de hidrocoloides. Para el sistema más ordenado (gluten-LBG), la relación correspondiente a la intensidad de las bandas de las conformaciones t-g-t, g-g-t y g-g-g están en una relación expresada para números enteros (Tu, 1982; Carey, 1982). Se observó un pronunciado cambio en la proporción de las distintas conformaciones disulfuro en el caso del sistema gluten-PE.

3.4.3.3 Composición de las fracciones de gliadinas y gluteninas

Las subunidades de gliadinas y gluteninas pueden ser separadas por SDS PAGE (Shewry y col. 2003). En la Figura 3.16 se observan los perfiles electroforéticos de las gliadinas extraídas de la masa control y masa con hidrocoloides. No se detectaron diferencias en el perfil de gliadinas al comparar las distintas muestras entre sí. En todos los casos, excepto para las masas con GG se extrajeron proteínas de alto peso molecular (> 97 KDa), indicando la existencia de agregados solubles. Estos agregados podrían estar unidos a gluteninas HMW a través de interacciones no covalentes (Shewry y col. 2001). Se observó un grupo definido de bandas en el rango de 30 y 45 kDa para todas las muestras, correspondientes a α , β y γ gliadinas y por debajo de 20,1 kDa se observaron varias bandas intensas correspondientes a péptidos de bajo peso molecular. Con respecto a la asignación de estas bandas, aunque las gliadinas tendrían un rango de pesos moleculares mayor, muchos autores (Anderson y col. 2001; Prasada Rao y col. 2002; Alaedini y col. 2006) han informado sobre la existencia de gliadinas con pesos moleculares menores a 30 kDa.

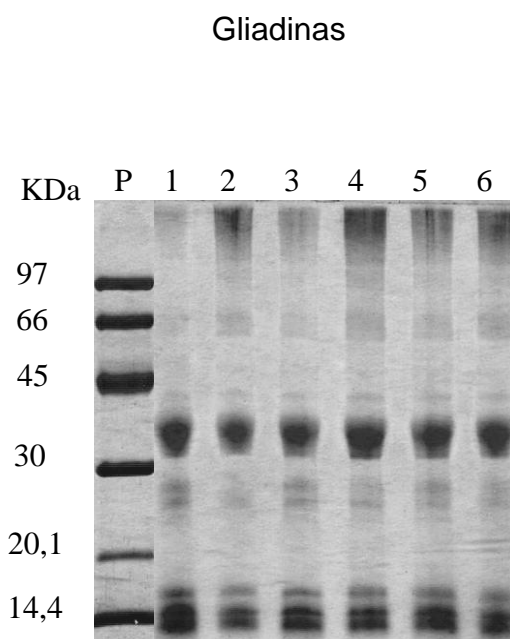


Figura 3.16 Perfil electroforético SDS-PAGE de gliadinas extraídas de las masas. Masa sin aditivo (1); masa con GX (2); GG (3); PE (4); LBG (5) y LBG+GX (6), P: patrón de pesos moleculares.

En la Figura 3.17 se muestran los perfiles de la fracción de gluteninas extraída con ácido acético. Las gluteninas de bajo peso molecular (gluteninas-LMW de masa molecular comprendida entre 20 y 50 kDa) se extrajeron en mayor proporción que las de alto peso molecular (gluteninas-HMW de masa molecular 75 kDa). Posiblemente porque el ácido acético es un medio que disocia uniones iónicas sin afectar en gran medida las uniones hidrofóbicas ampliamente presentes en la red de gluten.

Se observa que de las masas preparadas con GX o LBG+GX (en comparación con otros hidrocoloides) se extrajo una menor cantidad de gluteninas. Estos resultados sugieren la formación de una red de gluten más entrecruzada en presencia de GX.

Como se describió en el Capítulo 2, en presencia de goma xántica la red de gluten obtenida resultó más elástica. Por otro lado las gluteninas-LMW fueron más lábiles en presencia de GG, PE y LBG.

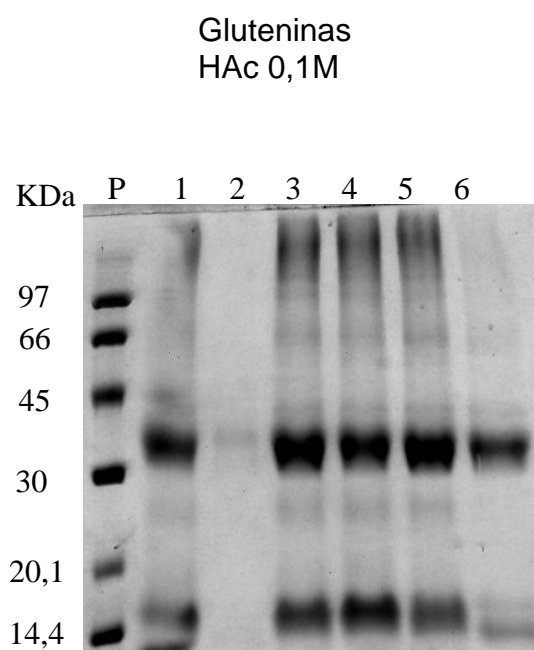


Figura 3.17 Perfil electroforético SDS-PAGE de gluteninas extraídas de las masas. Masa sin aditivo (1); masa con GX (2); GG (3); PE (4); LBG (5) y LBG+GX (6), P: patrón de pesos moleculares.

Cuando las gluteninas fueron extraídas con un agente reductor como ditioneitol (DTT), ambos tipos de subunidades, LMW-GT y HMW-GT fueron observadas en los perfiles electroforéticos (Figura 3.18). No se evidenciaron diferencias en los perfiles de HMW-GT, aunque en las muestras con LBG+GX se detectó una menor proporción de estas proteínas y de agregados.

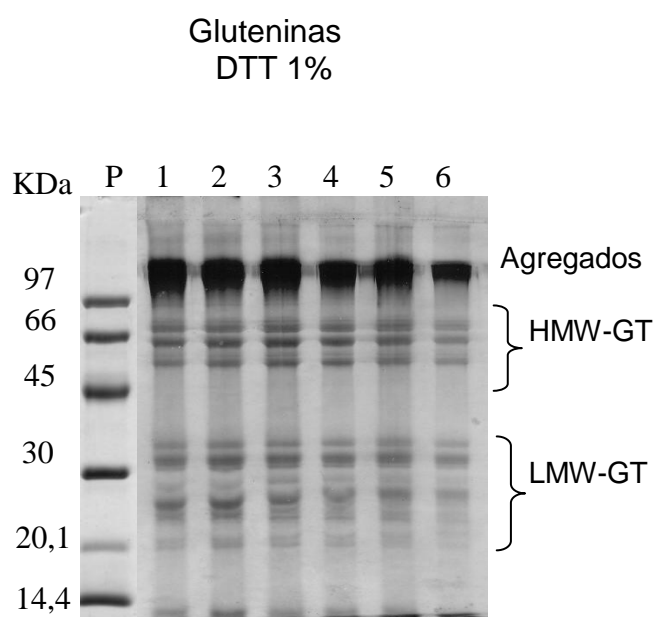


Figura 3.18 Perfil electroforético SDS-PAGE de gluteninas extraídas a partir de las masas. Masa sin aditivo (1); masa con GX (2); GG (3); PE (4); LBG (5) y LBG+GX (6), P: patrón de pesos moleculares.

De los resultados de electroforesis se puede concluir que la presencia de goma durante la formación del gluten puede afectar la fuerza de las uniones de ciertas subunidades de proteínas. Las diferencias en el tipo de red de gluten también se vieron reflejadas en las distintas estabilidades farinográficas encontradas para cada masa con el agregado de hidrocoloides como se describió en el capítulo previo.

3.5 Conclusiones parciales

En conclusión, se puede afirmar que incluso en presencia de suficiente cantidad de agua y un óptimo tiempo de desarrollo, las masas con hidrocoloides fueron afectadas en la conformación de su red de gluten. En muchos de los casos las proteínas del gluten resultaron más desplegadas y cambió también la conformación de los enlaces disulfuro. Los hidrocoloides también produjeron un cambio de la labilidad de las proteínas de la red, pudiendo ser extraídas más subunidades en casi todos los casos, las que no estarían vinculadas a través de uniones covalentes.

Estos cambios conformacionales del gluten en presencia de hidrocoloide conducen en cada caso a matrices más o menos rígidas, lo que se refleja en la movilidad molecular determinada por RMN. Una mayor movilidad se encontró en las matrices que contenían goma xántica GX, sugiriendo una red más flexible. Por otro lado, el agregado de pectina (PE) conduce a la formación de una red de gluten más desordenada pero menos flexible, lo que concuerda con una menor estabilidad de la masa como se vio en los ensayos farinográficos.

En general, la adición de hidrocoloides promueve la formación de redes más desordenadas y lábiles. El grado de rigidez y la capacidad de retener agua dependió del tipo de hidrocoloides agregado. En el caso de pectina, la interacción con la proteína condujo a una matriz más lábil y menos móvil mientras que el agregado de goma guar generó matrices más móviles pero a la vez más estables frente a una acción mecánica, lo que revela, de conjunto, una buena compatibilidad entre este hidrocoloide y la red de gluten.



Capítulo 4

Efecto de los hidrocoloides sobre el proceso de panificación y atributos de calidad de los panes

4 Introducción

La calidad del pan se puede definir a través de tres categorías, calidad externa (volumen, apariencia, color y crocantez de la corteza), calidad interna (tamaño, número y distribución de los alvéolos de la miga, color de la misma) y calidad asociada a la textura (dureza, masticabilidad y elasticidad de la miga) (Cauvain 1998).

Las características visuales y texturales de la miga de pan son los atributos claves que determinan la calidad global del producto tanto para el productor como para el consumidor (Pyler 1978). Entre los muchos factores que influyen sobre estas características se encuentran fuerza de la harina, contenido de proteína, absorción de agua, presencia de oxidante, presencia de grasa panadera y factores de proceso como laminado y tiempo de leudado (Zghal y col 2001).

En general, el pan se aprecia mejor al consumirlo fresco, recién horneado, que es cuando el producto posee las características de calidad óptimas. Sin embargo el transcurrir del tiempo, el pan pierde esas propiedades y sufre un proceso denominado envejecimiento.

Se denomina “envejecimiento del pan” a los cambios producidos en la calidad del pan durante el enfriamiento y almacenamiento. Estos cambios se traducen en una disminución gradual de la aceptación del pan por los consumidores y son los que limitan la vida útil del producto. Durante este proceso la miga se torna más dura, seca y desmenuzable, la corteza se ablanda y se pierde aroma y sabor. Los fenómenos físicos principales involucrados en el envejecimiento son la retrogradación del almidón que conduce al endurecimiento de la miga y la redistribución y migración de agua desde el interior del pan a la corteza (He y Hosney, 1990; Pateras, 1998; Gray y Bemiller, 2003).

Los hidrocoloides son utilizados como mejoradores en la panificación por poseer la propiedad de retener humedad y alargar ligeramente la vida útil del producto (Stauffer, 1990). Diversos autores han descripto la funcionalidad de diferentes hidrocoloides sobre la calidad y vida útil de productos panificados. Gómez y col. (2006) observaron el efecto de HPMC, carragenano, alginato de

sodio y pectina de alto metoxilo, goma garrofín, goma guar y goma xántica sobre bizcochuelos y encontraron que la goma garrofín permitió disminuir las pérdidas de humedad en un 40% después de 3 días de almacenamiento. Estos autores también informaron que la presencia de hidrocoloides incrementó en general la firmeza de la miga. Por otro lado, Guarda y col. (2004) en ensayos sobre pan tipo francés hallaron un efecto de ablandamiento de la miga al utilizar ciertos hidrocoloides (HPMC, alginato) mientras que otros producían el efecto contrario (goma xántica) o no producían efecto alguno (carragenano). Estos resultados indican que dependiendo del tipo de producto panificado y de la estructura y nivel utilizado de hidrocoloide, se podrían obtener diferentes resultados sobre los atributos texturales. Estos mismos autores informaron que HPMC y alginato fueron los mejores agentes antienviejecimiento conduciendo a migas menos duras durante el almacenamiento. Azizi y Rao (2003) encontraron un efecto positivo sobre el volumen de pan cuando agregaron distintos hidrocoloides (goma xántica, karaya, guar y garrofín) particularmente en mayor grado cuando se usaron los galactomananos. Los resultados que existen en literatura indican que no se puede generalizar respecto al efecto de los hidrocoloides. Tampoco abundan los trabajos que relacionen los efectos encontrados con las características estructurales de estos aditivos, debido quizá a la complejidad estructural de los mismos y a los múltiples efectos que pueden provocar en una matriz alimentaria.

Además de las técnicas tradicionales utilizadas para evaluar la calidad de los panes obtenidos se ha hecho hincapié en los últimos 15 años en el análisis de imágenes, que brinda una herramienta objetiva y cuantitativa para medir las características de la miga (Sarpinstein, 1999). Desde más tiempo se viene utilizando el análisis de textura, en particular los ensayos de compresión para una evaluación reológica de la miga. En los últimos años se han incrementado los trabajos sobre ensayos de elongación (Zghal y col. 2001).

Para analizar la evolución del envejecimiento en el tiempo se utilizan técnicas tales como, la determinación de humedad de la miga, análisis de los

parámetros de perfil de textura de la miga y la retrogradación de amilopectina por calorimetría diferencial de barrido (Guarda y col. 2004).

Los **objetivos** de este capítulo fueron:

- a) Analizar el efecto del agregado de hidrocoloides sobre la calidad del pan obtenido utilizando distintas técnicas.
- b) Analizar el efecto de los hidrocoloides sobre la textura de la miga en función del tiempo de almacenamiento.
- c) Correlacionar la calidad observada con los fenómenos microestructurales obtenidos en el capítulo anterior de masa y gluten.

4.1 Materiales

Harina: para estos ensayos se utilizó harina de trigo comercial tipo 000 (CAA) provista por Molino Campodónico (La Plata. Argentina).

Hidrocoloides: se utilizaron los siguientes hidrocoloides comerciales provistos por Saporiti S.A (Buenos Aires. Argentina): goma guar (GG), goma garrofín (LBG), pectina de alto metoxilo (PE), goma xántica (GX). Las concentraciones empleadas fueron 0,5 y 1,5% (base 100 g de harina). Se utilizó además una mezcla de garrofín y xántica (LBG+GX) en proporciones iguales de ambos hidrocoloides (1:1), agregándose en el mismo rango de concentración que las demás gomas.

Las características de la harina y los hidrocoloides utilizados para estos ensayos son las especificadas en el Capítulo 2.

4.2 Metodología

4.2.1 Proceso de panificación

4.2.1.1 Formulación de la masa

Para la preparación de las masas se empleó una amasadora marca Kenwood Major 1200 W (Italia) de capacidad 6.7 l.

Los panes fueron preparados según la siguiente formulación: 100% harina 000, 2% sal comercial (Celusal, Argentina), 3% levadura prensada comercial (Calza, Argentina), agua según absorción farinográfica correspondiente a cada mezcla e hidrocoloides en dos concentraciones (0,5% y 1,5%). Los porcentajes están expresados cada 100 g de harina.

4.2.1.2 Determinación del tiempo óptimo de fermentación

Se prepararon masas según la formulación descrita anteriormente. Se amasó según el tiempo de desarrollo farinográfico correspondiente a cada masa, se dejó reposar 10 minutos, se laminó y se dejó reposar por otros 10 minutos. Se colocaron dos piezas de 50 g en probetas graduadas de 1 l de capacidad, provistas de un émbolo de chapa que es apoyado sobre la masa. La boca de la probeta se cubrió con una tapa de acrílico. Se llevó a la cámara de fermentación (Rotar, Brito Hnos. Argentina) regulada a 30 °C y cada 10 minutos se midió el aumento del volumen hasta que se alcanzó un valor constante. Se obtuvieron las curvas de volumen de la masa en función del tiempo de fermentación. Se realizaron duplicados de masa. Se determinaron los parámetros de tiempo y volumen de fermentación de la masa.

4.2.1.3 Obtención de los panes

Para la elaboración de los panes se utilizó un método directo, donde se incorpora la levadura a todo el volumen de la masa, el método más tradicional de panificación. En la Figura 4.1 se muestra un diagrama de flujo del proceso de panificación.

Como primer paso, se suspendieron 12 g de levadura en la cantidad de agua determinada según los datos de absorción farinográfica para cada mezcla. Se dispersó adecuadamente para obtener una suspensión uniforme. En el recipiente de la amasadora se colocaron 400 g de harina, se le agregaron 8 g de sal fina y el hidrocoloide; luego se pre-mezclaron estos ingredientes en seco. En el primer minuto de amasado se agregó la suspensión de levadura en agua a la velocidad I (52 rpm) de la amasadora con el fin de formar el bollo, el tiempo restante se amasó en la velocidad II correspondiente a 89 rpm.

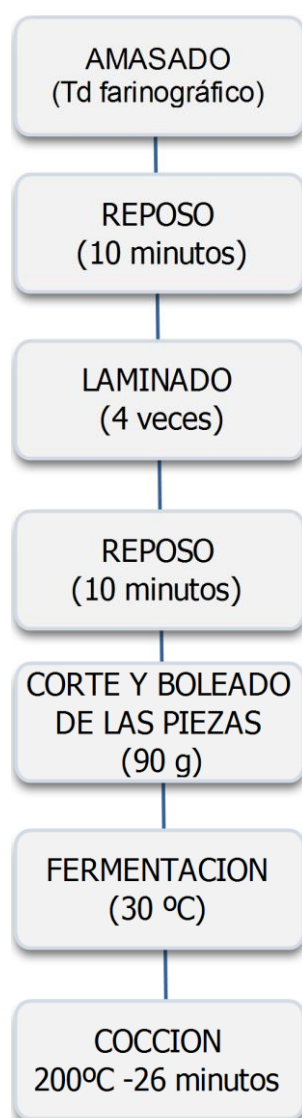


Figura 4.1 Esquema del proceso de panificación utilizado.

El tiempo de amasado establecido fue el tiempo de desarrollo farinográfico de cada mezcla. Una vez finalizado el tiempo de amasado la masa se dejó en reposo durante 10 minutos cubierta con un film a temperatura ambiente. Luego se pasó por la laminadora 4 veces y se dejó reposar por otros 10 minutos. Se cortaron porciones de 90 g de masa, se bolearon (para obtener piezas de forma aproximadamente esférica y de superficie lisa) y fueron pasados por la armadora (Zambón, Argentina) para darles la forma final. Se dispusieron en una placa y se llevaron a la cámara de fermentación a 30 °C (Rotar Brito Hnos. Argentina). Se dejó fermentar de acuerdo al tiempo óptimo hallado según las curvas de fermentación para cada masa. La cocción se efectuó en un horno marca Ariston XF 995.3 (Italia) regulado a 200 °C, durante 26 minutos. Los panes se dejaron enfriar al menos una hora a temperatura ambiente antes de utilizarlos para realizar los ensayos.

4.2.3 Evaluación de la calidad de los panes

4.2.3.1 Color de la corteza

Se determinó el color de la corteza según el método 14-22 AACC. Para este ensayo se utilizó un colorímetro triestímulo (Minolta CR 400. Osaka. Japón). Se realizaron tres mediciones de color por pieza de pan.

Para las medidas se utilizó como espacio de color el modelo CIELAB (CIE. 1976 $L^*a^*b^*$) en el cual L^* se define como luminosidad ($L^*=0$ que corresponde al negro y $L^*=100$ al blanco), a^* es el eje que representa la variación de color de verde (valores negativos) al rojo (valores positivos). El eje b^* corta al eje a y va del azul (valores negativos) al amarillo (valores positivos).

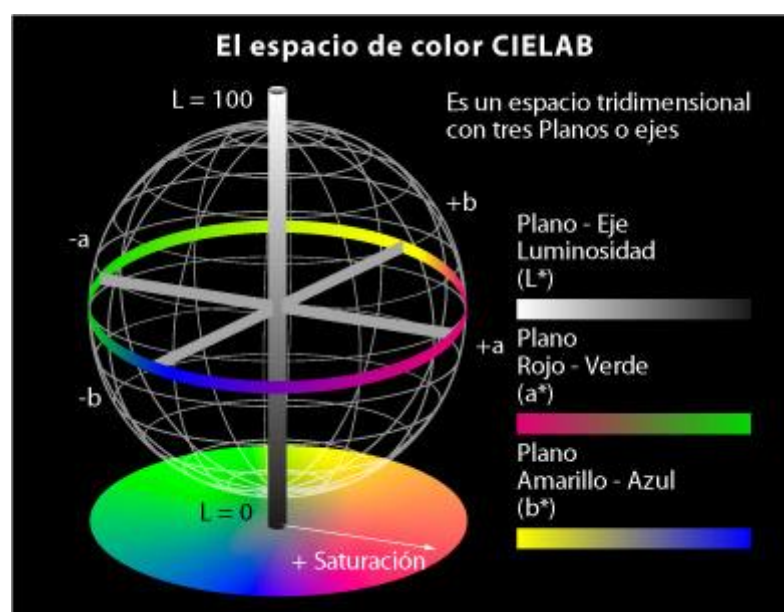


Figura 4.2 Representación gráfica del modelo CIELAB. Los ejes a^* y b^* colocados a la altura del valor 50 de L . Fuente: http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_lab.

Se calculó el Índice de Pardeamiento (IP) de acuerdo a Buera y col. (1985):

$$IP = \frac{100 (x - 0,31)}{0,172} \quad (4.1)$$

$$x = \frac{a + 1,75 L}{5,645 L + a - 3,012 b} \quad (4.2)$$

dónde

a: posición entre verde y rojo

b: posición entre azul y amarillo

L: luminosidad

4.2.3.2 Volumen específico

El volumen específico resulta de dividir el volumen de la pieza cocida de pan por el peso de la misma. El volumen de la pieza de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza en un pan volumenómetro.

Este dispositivo está formado por dos receptáculos cerrados conectados por un tubo graduado transparente de sección conocida. Se llena parcialmente con semillas de colza y se lee, en el tubo graduado, la altura inicial del volumen ocupado por las semillas, antes de ser colocado el pan. Luego se fija el pan en uno de los receptáculos y se dejan caer libremente las semillas sobre él, leyendo nuevamente la altura. La diferencia de altura multiplicada por la sección del tubo da el volumen desplazado por el pan. Dividiendo el volumen por el peso de cada pieza se obtiene el volumen específico. Se midieron cuatro piezas de pan de cada panificación y se realizaron dos panificaciones diferentes para cada muestra.

4.2.3.3 Alveolado de miga por análisis de imágenes

Se cortaron rodajas del centro de los panes que fueron escaneadas con un scanner HP Scanjet 4070 Photosmart. Para el análisis de la imagen se utilizó el software Image J 1.43.

De cada imagen (Figura 4.3a) se recortó un cuadrado de la parte central (Figura 4.3b). Se transformó la imagen a valores de gris (Figura 4.3c) y finalmente se binarizó (Figura 4.3d) aplicando un algoritmo para determinar el umbral que delimita las celdas de aire o alvéolos de la matriz sólida. De los algoritmos disponibles en el software se utilizó el umbral OTSU.

Para transformar las dimensiones de la imagen de pixeles a una unidad adecuada (mm) se calibró con una escala escaneada en las mismas condiciones que las fotos. Con el mismo software se realizó el análisis estadístico de las fotografías en base un mínimo de 600 alvéolos. Los

parámetros determinados fueron área total ocupada por los alvéolos, área promedio del alveolo, fracción de área (área ocupada por alveolo /área total) y circularidad promedio de los alvéolos. La circularidad es el parámetro que indica cuanto se desvía el área de un alveolo respecto a la de un círculo perfecto (circularidad=1). Se obtuvieron también los histogramas de frecuencia en función de su área.

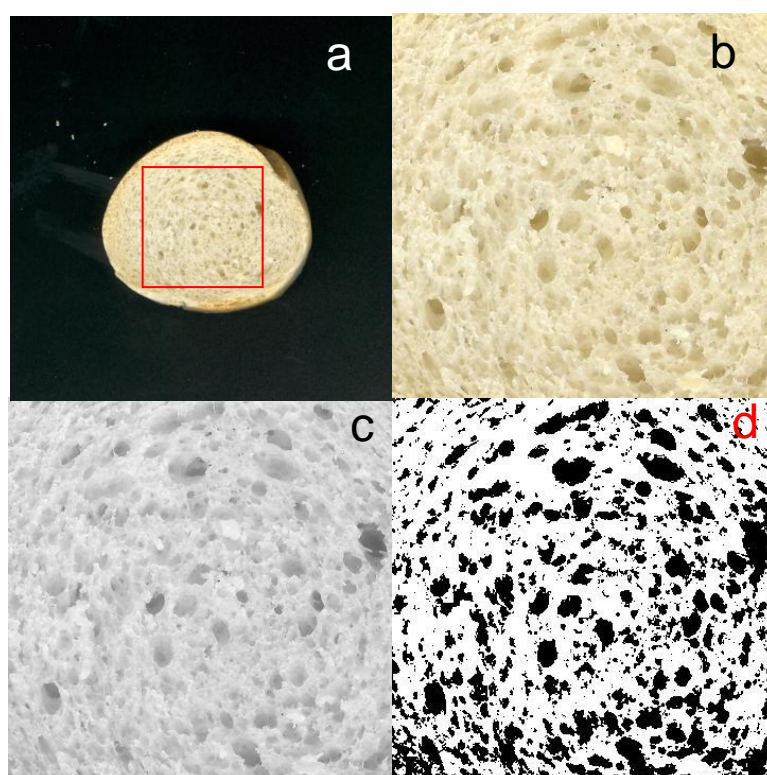


Figura 4.3 Secuencia de imágenes del área seleccionada de la rodaja de pan. a) rodaja de pan; b) cuadrado central de la rodaja; c) imagen en escala de grises y d) imagen binarizada.

4.2.3.4 Análisis de Perfil de Textura de la miga

Para realizar los ensayos de análisis de perfil de textura de la miga se utilizaron rodajas de pan de 2 cm de alto las cuales fueron sometidas a dos ciclos de compresión de 40 % de la altura original con una sonda cilíndrica de 25 mm de diámetro. Las curvas de fuerza en función del tiempo fueron obtenidas a una velocidad de desplazamiento de la sonda de 0,5 mm/s. Se determinaron los parámetros de dureza, cohesividad, elasticidad, resiliencia y masticabilidad. El perfil de textura de la miga fue obtenido usando un equipo TA.XT2i Texture Analyzer (STABLE MICRO SYSTEMS. Surrey. Reino Unido) con un software Texture Expert for Windows, versión 1.2.

4.2.4 Ensayos de almacenamiento

Los ensayos de almacenamiento se realizaron en los intervalos de tiempo de 0, 1 y 3 días. Los panes se almacenaron en bolsas herméticas de polietileno en una cámara a 25 °C.

4.2.4.1 Humedad de la miga

Se determinó la humedad de la miga según el método AACC 44-15A. Se pesaron 3 g de la miga de pan y se llevó a estufa Estigia (Argentina) a 135 °C durante 2 hs.

4.2.4.2 Análisis de perfil de textura

En cada intervalo de tiempo se tomaron cuatro piezas de pan, se cortaron dos rodajas de 2 cm de alto desechando los extremos. Se obtuvo el perfil de textura

en cada caso como fue descrito anteriormente en la sección 4.2.3.4. Se calculó el incremento de los parámetros de textura (dureza, cohesividad, resiliencia, masticabilidad) a los días 1 y 3 de almacenamiento, respecto al día 0, según ec. 4.3:

$$\Delta X (\%) = \frac{X_t - X_o}{X_o} 100 \quad (4.3)$$

donde

X_t = valor al tiempo t

X_o = valor al tiempo 0

4.2.4.3 Retrogradación del almidón por calorimetría diferencial de barrido

Estos ensayos contribuyen al conocimiento de los cambios sufridos (en presencia de los hidrocoloides) por el almidón durante el horneado (gelatinización del almidón) y el almacenamiento (retrogradación) del pan. Este ensayo consiste en el calentamiento de las muestras simulando el proceso de cocción del pan en el horno, luego almacenar las cápsulas con las muestras por un intervalo de tiempo de 0, 3 y 7 días y luego volver a calentar las muestras.

Para este ensayo se utilizó un calorímetro Q100 (TA Instruments. EE.UU). Para la calibración del equipo se utilizó un patrón de Indio.

Se colocaron pequeñas cantidades de masa, sin el agregado de levadura (10-14 mg) en cápsulas de aluminio y se sellaron herméticamente. Las cápsulas se colocaron en la celda del equipo junto a una cápsula vacía como referencia. Las muestras se sometieron a un calentamiento programado desde 20°C a 130°C a una velocidad de 10°C min⁻¹. Se determinaron los parámetros de temperatura inicial (Ti), de pico (TPI) y final (Tf), y la entalpía (ΔH) del proceso.

4.3 Análisis estadístico

Los resultados de las distintas variables estudiadas en este capítulo se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA. Se utilizó el test de Tukey y LSD para la comparación de medias a un nivel de significación del 0,5% ($p < 0,05$). Para este análisis se utilizó el software Systat 10.2 (Systat Inc. 2002. EE.UU.).

4.4 Resultados

4.4.1 Tiempos de fermentación

En la Figura 4.4 se muestra una curva exponencial típica que presenta el volumen de las masas durante la fermentación. Se observa que se alcanza un máximo de volumen. La prolongación excesiva del tiempo de fermentación ocasiona un descenso de volumen debido al colapso de la masa. La determinación del volumen máximo es importante debido a que las piezas se deben dejar levar hasta un volumen inferior a él ya que en el horno sufren un aumento de volumen adicional producto de la expansión de los gases. Un sobre levado de la masa conduciría al colapso de la pieza. Se estima que el volumen óptimo de levado es de tres cuartas partes del volumen máximo. Alcanzado este volumen la pieza se introduce en el horno.

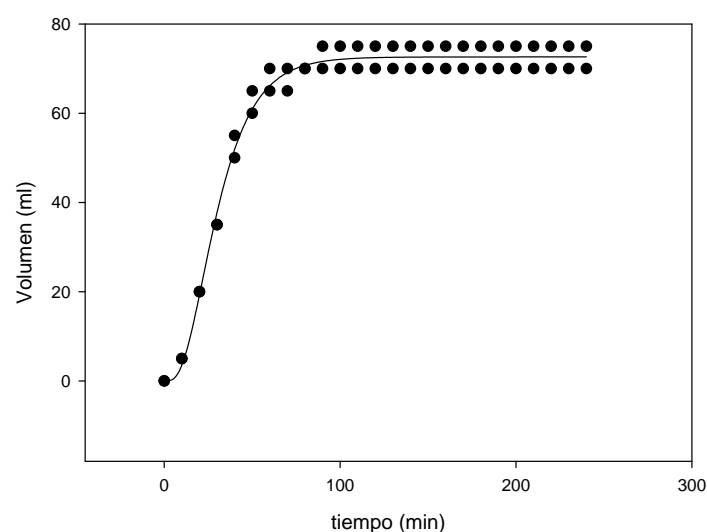


Figura 4.4 Curva típica de fermentación de masa de harina de trigo.

Para poder comparar curvas entre si y calcular el tiempo que cada masa tarda en alcanzar 3/4 del volumen máximo se modelaron las curvas. Se ensayaron distintos modelos matemáticos exponenciales y el de mejor ajuste resultó el de Chapman, de acuerdo a la ecuación:

$$Y = a (1 - e^{-bx})^c \quad (4.4)$$

donde:

Y: volumen de masa

x: tiempo de fermentación

a: volumen máximo

b, c: constantes

De la ecuación se obtuvieron los valores de a, b y c que son parámetros de ajuste de los cuales a es el volumen máximo de las masas alcanzado durante la fermentación (Tabla 4.1). Se observa que para la concentración 0,5% el volumen fue mayor que el control para PE y LBG+GX, mientras que para GX,

GG y LBG el volumen fue menor que el control. Por otro lado para la concentración de 1,5% de hidrocoloide, GG, PE y LBG dieron volúmenes mayores mientras que con GX y LBG+GX fueron menores que el control. En general se observa una tendencia a aumentar el volumen máximo en las masas con GG, PE y LBG cuando se aumenta la concentración de hidrocoloide.

Tabla 4.1 Volumen máximo y tiempos óptimos de fermentación de las masas sin y con hidrocoloide, obtenidos a partir del modelado de las curvas de fermentación.

muestra	Volumen máximo de las masas (ml)		Tiempo óptimo de fermentación (min)	
	0,5%	1,5%	0,5%	1,5%
C	95,8 (1,3)	95,8 (1,3)	49 (0,9)	49 (0,9)
GX	85,5 (1,2)	84,6 (2,2)	53 (0,7)	64 (0,6)
GG	91,1 (2,1)	108,8 (1,3)	49 (0,5)	66 (0,4)
PE	100,8 (2,0)	112,5 (1,6)	72 (0,9)	85 (0,8)
LBG	83,3 (5,6)	103,8 (1,5)	63 (0,7)	62 (0,5)
LBG+GX	102,2 (2,0)	83,9 (1,5)	74 (0,7)	69 (0,5)

Entre paréntesis se indica la desviación estándar

Por otro lado se puede observar que GX dificulta la expansión de la masa, independientemente de la concentración, lo cual es razonable ya que es la masa que presentó mayores valores de P (tenacidad) y menores valores de L (extensibilidad) en el alveograma y mayor dureza en los ensayos de textura (Capítulo 2 ítem 2.4.3). Asimismo, se observó que la red estaba probablemente

estabilizada por agregados de gliadinas de difícil extracción en medios ácidos diluidos y por un mayor entrecruzamiento de la red de gluten que se refleja en la baja labilidad de las subunidades de glutenina (Capítulo 3, ítem 3.3.4).

Ingresando en la ecuación con un volumen $Y = 0,75 * a$ ($a = V_{max}$) se obtuvieron los tiempos óptimos de fermentación que se detallan en la Tabla 4.1.

En todos los casos los tiempos resultaron mayores o iguales al del control y se incrementaron cuando se aumentó el nivel de hidrocoloide salvo en el caso de LBG y LBG+X. En comparación con GX, la masa con PE se expandió más, pero le llevó mayor tiempo el proceso. Estos resultados sugieren que una masa de estructura menos ordenada y con mayor tendencia al aflojamiento o despolimerización como la masa con PE necesitaría mayor tiempo para alcanzar el volumen de levado adecuado para producir un pan de buena calidad. Rosell y col. (2001) observaron que la adición de hidrocoloides como la goma xántica y el alginato producían una pronunciada disminución de la altura de la masa, en concordancia con una reducción de la extensibilidad y un aumento de la resistencia alveográfica. Estos autores atribuyeron a la interacción proteína-hidrocoloide la limitación en la expansión de la masa durante toda la etapa de fermentación, lo que conducía a la obtención de volúmenes menores. Sin embargo, en el presente trabajo los volúmenes se incrementaron en algunos casos, indicando un efecto positivo de ciertos hidrocoloides. Los autores citados también observaron en general, un aumento de los tiempos de fermentación, en concordancia con lo informado en el presente trabajo. De acuerdo a estos resultados, el agregado de hidrocoloides permitiría, al obtener en general masas más estables que toleran mayores tiempos de fermentación, la realización tanto de procesos de fermentación corta como de los tradicionales, de fermentación más larga.

4.4.2 Efecto de los hidrocoloides sobre el color de la corteza

El color de la corteza del pan es producto de una serie de reacciones complejas que se conocen como reacción de Maillard, un tipo de pardeamiento no enzimático. La primera etapa de esta reacción ocurre entre un azúcar reductor y un grupo amino libre que puede pertenecer a un aminoácido o a una cadena lateral de proteína, incluyendo la formación de una base de Schiff entre el grupo carbonilo del azúcar (forma abierta) y el grupo amino (que no debe estar bloqueado por protón). Se forma así una glucosamina que se reordena (reordenamiento de Amadori) para dar lugar a una serie de reacciones con formación de intermediarios dicarbonílicos muy reactivos que se condensan generando compuestos de alto peso molecular y dobles enlaces conjugados, que absorben en el visible (melanoidinas o pigmentos pardos). Se forman al mismo tiempo compuestos de bajo peso molecular, responsables del sabor y aroma característicos del pan. En la corteza del pan, la dextrinización que ocurre por las altas temperaturas y la deshidratación generan los sustratos adecuados para que esta reacción ocurra. El pan adquiere así una tonalidad entre marrón y rojiza característica, que queda representada por los parámetros que están indicados en la Tabla 4.2.

Para la concentración 0,5% se observó un aumento significativo de L^* solamente para los panes preparados con LBG+GX, indicando una corteza más clara. Para 1,5% se observó un aumento significativo de L^* , no sólo con LBG+GX sino también con GX y una disminución en el caso de PE y LBG. Un incremento en los valores de a^* y b^* significa un color más tostado. Los valores de a^* presentaron una disminución significativa en el caso del agregado de LBG+GX en ambos niveles de hidrocoloide. Se observó en general una tendencia a valores más altos de a^* cuando el nivel fue de 1,5%. Los valores de b^* aumentaron significativamente con el agregado de GX y disminuyeron cuando se le agregó LBG+GX para ambas concentraciones.

Tabla 4.2 Parámetros de color de la corteza de la miga

Nivel goma	Parámetros de color	C	GX	GG	PE	LBG	LBG+GX
0,5%	L*	68,1 b (2,5)	69,5 b (2,9)	69,9 b (3,0)	69,1b (3,8)	69,6 b (3,2)	72,7 a (1,7)
	a*	8,5 a (1,5)	7,5 a (2,0)	7,3 a (1,9)	7,5 a (2,3)	7,4 a (1,9)	4,8 b (0,9)
	b*	35,5 b (1,6)	37,4 a (1,3)	36,7 ab (1,6)	35,3 bc (2,3)	36,4 ab (2,0)	33,9 c (1,7)
	IP	79,3	81,2	78,4	76,1	78,2	64,9
1,5%	L*	68,1 b (2,5)	73,0 a (2,7)	68,4 b (5,0)	66,9 c (3,1)	67,0 c (1,6)	71,6 a (1,6)
	a*	8,5 b (1,5)	8,8 b (1,8)	10,0a (2,2)	9,9 a (2,5)	9,0 ab (1,0)	5,9 c (0,8)
	b*	35,5 c (1,6)	39,7 a (1,4)	39,4 a (2,8)	38,8 a (2,8)	37,1 b (1,2)	32,0 d (1,1)
	IP	79,3	83,2	91,6	92,5	86,2	62,9

Letras diferentes dentro de cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).
Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

Las muestras con hidrocoloides en un nivel de 0,5 % presentaron Índices de Pardeamiento (IP) similares al control excepto con el agregado de LBG+GX, en donde se observó menor desarrollo de color. Cuando se incrementó el nivel de hidrocoloide (1,5%) se observó mayor pardeamiento para los panes con GG y PE y menor pardeamiento para los panes con LBG+GX.

Si bien en el color inciden otros factores que tienen que ver con el proceso de horneado, estos resultados indican que la combinación LBG+GX pueden inhibir parcialmente el desarrollo de la reacción de Maillard, probablemente por dificultades de difusión de los sustratos de la reacción. Otros autores (Rodge y col 2012) hallaron valores de color más intensos en la corteza para panes con cantidades crecientes de GG, resultados que coinciden con los hallados en el presente trabajo.

4.4.3 Volumen específico

El volumen específico es un importante indicador indirecto de la calidad de la miga. Un mayor volumen específico está indicando un mayor volumen de pieza por peso, condición relacionada con una miga más aireada y por lo tanto más esponjosa (Sluimer, 2005). Este resultado solamente se logra cuando la masa ha sido capaz de retener los gases durante la fermentación y el horneado, aptitud que puede relacionarse a su vez con una mejor calidad de la red de gluten.

En la Figura 4.5 se muestran los resultados de volumen específico para los dos niveles de hidrocoloides ensayados. Al agregar goma se observó una tendencia a aumentar el volumen específico en el caso de la PE a ambos niveles. Con un nivel de 1,5% se observaron también mayores volúmenes específicos para los sistemas con GG y LBG, sin embargo las diferencias no llegaron a ser significativas respecto al control. Teniendo en cuenta el efecto sobre la microestructura de los hidrocoloides, un mayor volumen se vería favorecido por una interacción hidrocoloide-proteína que conduzca a redes más desordenadas. Aunque las diferencias no fueron significativas, la tendencia en el volumen específico fue similar a la del volumen máximo de masa fermentada. GG y LBG aumentaron dichos volúmenes con el nivel de hidrocoloide, mientras que GX en 1,5% impidió la expansión de la masa conduciendo a panes de menor volumen.

Los resultados informados en bibliografía respecto a la influencia de los hidrocoloides sobre el volumen de pan son disímiles. Según Rosell y col (2001), algunos hidrocoloides como HPMC y κ -carragenato en una concentración de 0,5% conducen a panes con mejor volumen específico y una miga más blanda. Otros autores (Azizi y col. 2003) han informado que la adición de GX, GG, LBG y Karaya no varió significativamente el volumen específico de los panes respecto al control en una concentración de 0,5%.

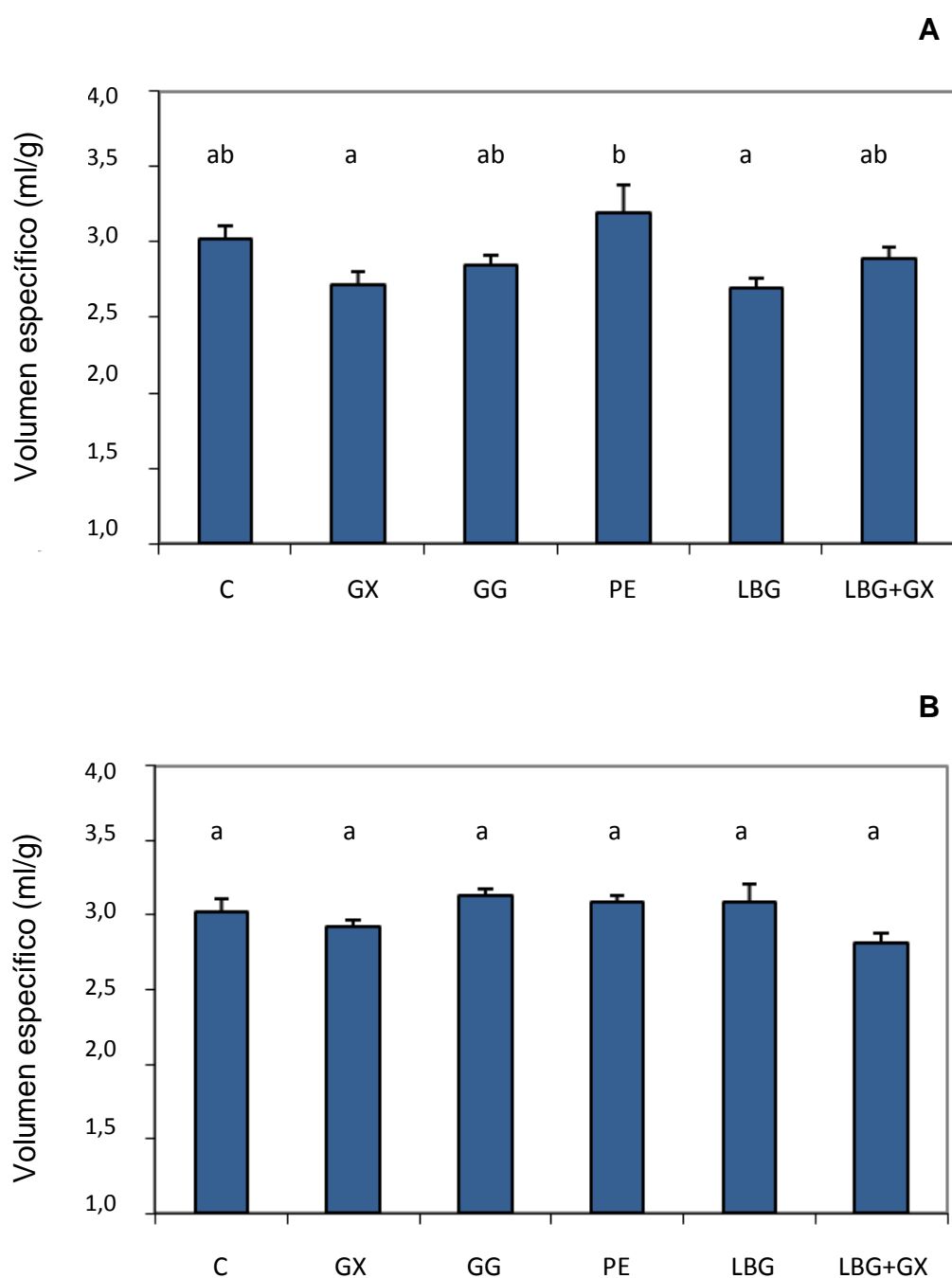


Figura 4.5 Volumen específico de los panes hechos con hidrocoloides en las concentraciones 0,5 (A) y 1,5% (B).

Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Rodge y col. (2012) observaron que el agregado de goma guar incrementaba el volumen de pan linealmente obteniéndose el máximo volumen con la concentración de 1% mientras que el mínimo correspondió a la muestra control. Los autores adjudicaron este efecto a un mayor desarrollo de la red de gluten y a la capacidad de retención de agua de la masa que mejoró con el agregado de GG.

4.4.4 Análisis de perfil de textura de la miga

En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestran en diagramas de barra los atributos de textura de miga más descriptivos para panes con distintos niveles de hidrocoloide.

La dureza de la miga (Figura 4.7) fue menor cuando se agregó a un nivel de 0,5% LBG, LBG+GX y PE, aunque significativo sólo con este último hidrocoloide. Este parámetro disminuyó aún más con el agregado de estos hidrocoloides a un nivel de 1,5%. A su vez la cohesividad de la miga aumentó significativamente al agregar con LBG+GX a 0,5% y también con GX para el nivel 1,5%. La obtención de migas más blandas y cohesivas en algunos casos (LBG+GX) es un hecho deseable. Una mayor cohesividad implica que la miga no se desgrana fácilmente.

La elasticidad no varió al agregar goma respecto al control en ninguno de los dos niveles utilizados. La resiliencia es la capacidad de recuperación instantánea del material al dejar de aplicar la fuerza que lo deforma y a diferencia de la elasticidad refleja solamente la componente elástica del sistema. Con el menor nivel de goma no se observó una tendencia definida (Figura 4.8), en algunos casos no hubo diferencias significativas con respecto al control; con GG disminuyó y con GX y PE aumentó significativamente. Al incrementar el nivel de hidrocoloide se observó un aumento significativo de este atributo con GX.

La masticabilidad es el producto entre la dureza, cohesividad y elasticidad; un aumento en la masticabilidad no es un atributo deseable en la miga. En el nivel más bajo de hidrocoloide disminuyó significativamente con PE mientras que en el nivel más alto disminuyó significativamente con PE, LBG y LBG+GX (Figura 4.8).

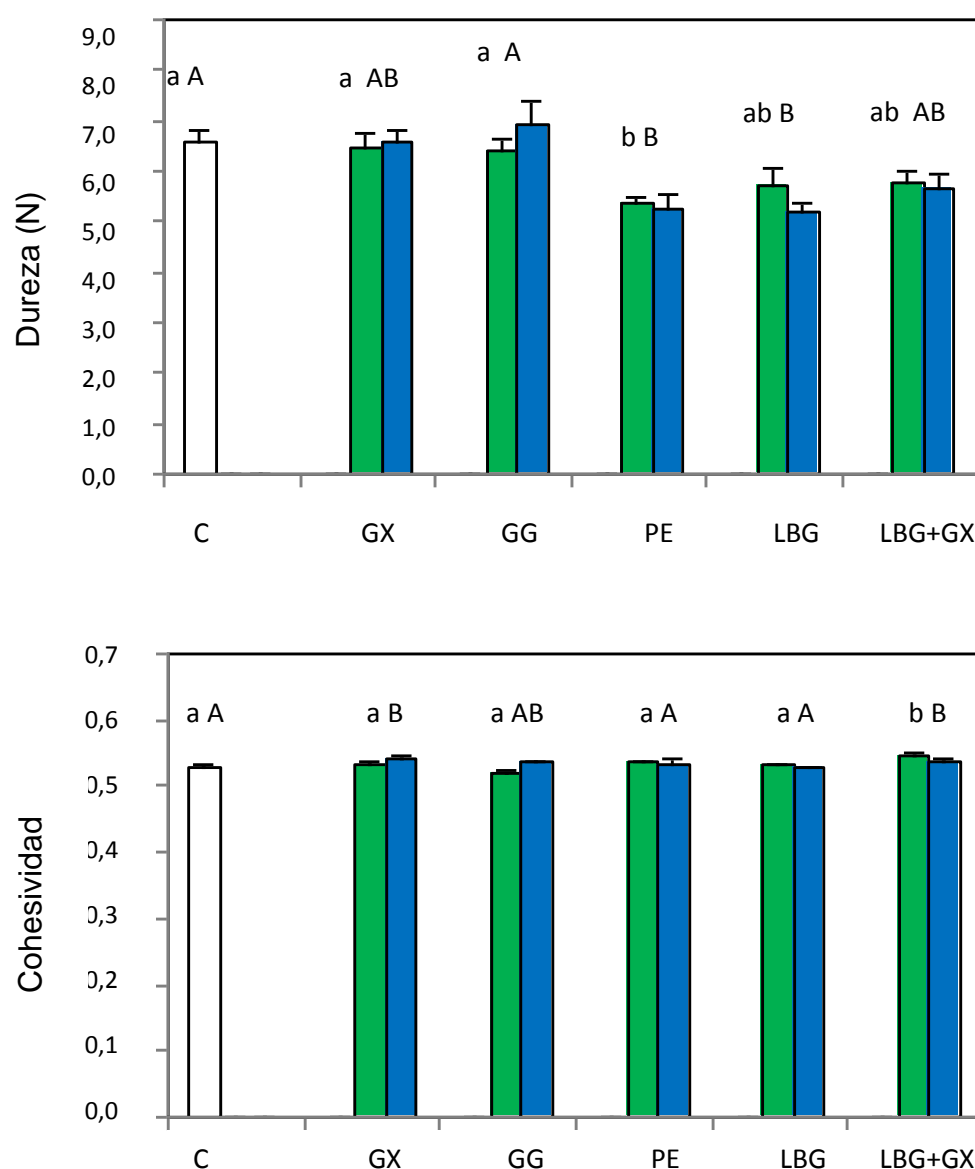


Figura 4.7 Dureza y cohesividad de la miga de pan. Blanco: control; verde: 0,5% y azul: 1,5% de goma. Letras minúsculas corresponden a migas con 0,5% de hidrocoloide, letras mayúsculas a migas con 1,5% de hidrocoloides. Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras dentro de una misma serie ($p < 0,05$).

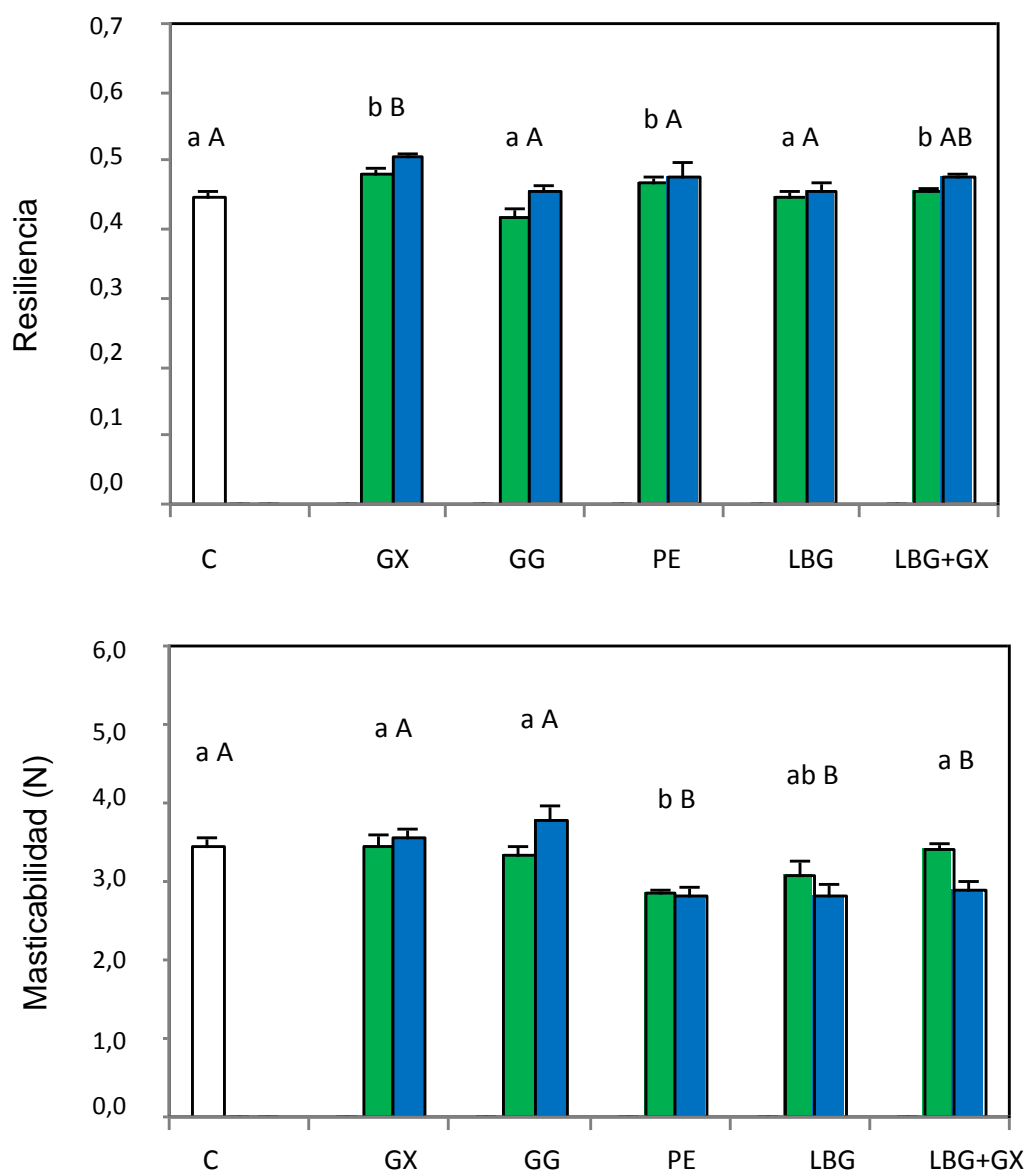


Figura 4.8 Resiliencia y masticabilidad de la miga de pan. Blanco: control; verde: 0,5% y azul: 1,5% de goma. Letras minúsculas corresponden a migas con 0,5% de hidrocoloide, letras mayúsculas a migas con 1,5% de hidrocoloides. Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras dentro de una misma serie ($p < 0,05$).

El ANOVA efectuado sobre los distintos parámetros del perfil de textura mostró que en la mayor parte de los atributos (dureza, cohesividad, resiliencia, masticabilidad) hubo un efecto significativo en un nivel de 95% de confianza ($p < 0,05$) del agregado de hidrocoloide en ambos niveles de concentración utilizados (0,5 y 1,5 %), dependiendo de la naturaleza del aditivo.

Respecto al efecto de los hidrocoloides sobre la textura de la miga existe controversia en la literatura. Según Rosell y col. (2001), adicionando hidrocoloides en un nivel de 0,5%, la dureza de la miga se reduce al utilizar κ -carragenato y HPMC, aumenta con goma xántica y no hay efecto con alginato de sodio. Guarda y col. (2004) encontraron en niveles similares de hidrocoloide la misma tendencia para goma xántica y HPMC pero no observaron efecto significativo con K-carragenato y sí observaron un ablandamiento de la miga con alginato. El aumento de dureza se debe según estos autores, al engrosamiento de las paredes de la miga que rodean los espacios de aire. Rodge y col. (2012) analizaron el efecto del agregado de goma guar sobre la calidad del pan utilizando niveles de 0,25 a 1 % (base 100 de harina). Estos autores también observaron un aumento en el volumen de las piezas de pan y una disminución de la dureza de la miga para los niveles más altos de goma, 0,75 y 1 % (respecto al control).

En el presente trabajo no se llegaron a observar diferencias significativas respecto al control con GX ni con GG pero sí un ablandamiento con los otros hidrocoloides.

Se debe remarcar que las diferencias entre los distintos trabajos obedece a diversos factores: las formulaciones de la matriz panaria, origen del hidrocoloide y nivel utilizado y particularidades del proceso de panificación que hacen difícil la comparación de resultados.

4.4.5 Humedad de la miga

Los resultados de humedad de la miga de los panes frescos (Día 0) se muestran en la Tabla 4.5 (Sección 4.4.7). Los mismos indican que para la concentración 0,5% la humedad varió entre 42,7 y 44,5%, mientras que para 1,5% de hidrocoloide el rango de humedades resultó entre 43,8 y 46,2%. Para migas con 1,5% de hidrocoloide se encontraron valores significativamente mayores respecto al control en todos los casos, excepto en los panes con PE. La mayor retención de humedad luego de la cocción, en la mayoría de los casos se puede vincular a la mayor cantidad de agua agregada a la masa (ver Tabla 2.3); excepto en el caso de la PE. Guarda y col (2004) encontraron un efecto similar con el agregado de hidrocoloides, observando en todos los casos una mayor retención de humedad tras el horneado.

4.4.6 Análisis del alveolado

En la Figura 4.9 se observan fotografías de las migas de pan, correspondientes a cortes típicos del centro de cada pieza de las muestras control C y LBG+GX, que muestran un mayor grado de compactación; y de PE que presenta una miga más abierta. En todos los casos el nivel de hidrocoloide fue de 1,5%.

Las fotografías fueron utilizadas para obtener parámetros representativos del tipo de alveolado, cuyo resumen se muestra en la Tabla 4.3.

Para un nivel de hidrocoloide de 0,5%, las muestras con GX presentaron una fracción de área alveolar (18,8%) significativamente inferior al control (32,2%), lo que indica una miga menos aireada, más compacta. En los otros casos no se llegaron a observar diferencias significativas. Respecto a la circularidad, parámetro relacionado con la simetría alveolar, se observa que GX presentó el mayor valor (0,62) y LBG el menor (0,49) indicando alvéolos más y menos cercanos a la circularidad, respectivamente.

En la Figura 4.10 se muestran las curvas que representan el número de alvéolos (como % acumulado) en función del área alveolar. En cada punto de la curva el valor que se lee en el eje de ordenadas está indicando la fracción porcentual de alveolos que se encuentra por debajo del área correspondiente del eje de abscisas. Se observan mayores diferencias en la zona de áreas entre 0,5 y 1 mm². Por ejemplo, para un nivel de hidrocoloide de 0,5% (Tabla 4.3), el porcentaje acumulado de alveolos con área menor o igual a 0,6 mm² resultó más alto que el control (68,1%) en el caso de GX y GG (ambos con 69,9) y menor para LBG (55,8%) y PE (60,8). Estos resultados indican que en los casos de GG y GX predominan alvéolos más pequeños y se halla un mayor porcentaje de alvéolos grandes para las muestras con LBG.

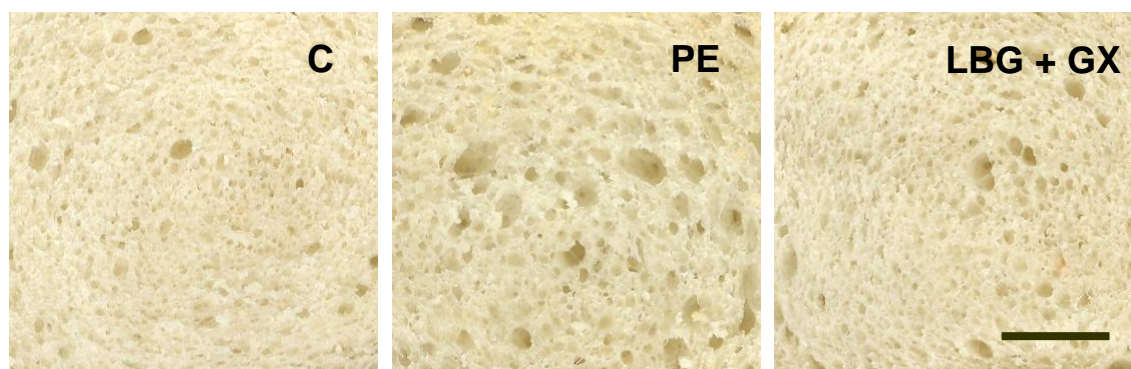


Figura 4.9 Imágenes escaneadas correspondientes al centro de las rodajas de pan con 1,5% de hidrocoloide. Barra= 10 mm

En un nivel de 1,5 % de hidrocoloide, la fracción de área total ocupada por los alvéolos varió entre 24,8 % (para GX) y 30,9% (para LBG), siendo en todos los casos menores que el control. La menor fracción de área total ocupada por los alvéolos se obtuvo para las muestras con goma xántica, GX y LBG+GX, indicando una miga más compacta como se observa en la Figura 4.9. En el caso de LBG y PE el menor porcentaje acumulado de alveolos con área < 0,6 mm² sugiere la presencia de alvéolos más grandes, como se observa en la

Figura 4.9 para PE. Respecto a la circularidad, solamente en el caso de GX fue significativamente menor que el control (0,46).

Comparando las características de migas con 0,5% de hidrocoloide y de las migas con 1,5% se observó que el área media de los alvéolos no presentó diferencias significativas.

Tabla 4.3 Parámetros del alveolado de la miga.

Nivel	Goma	Área Media (cm ²)	Circularidad (-)	Fracción de área (cm ²)	Alvéolos con área < 0,6 mm ² (% acumulativo)
	C	0,72 a (0,01)	0,52 b (0,01)	32,2 a (2,9)	68,1
0,5%	GX	0,77 a (0,01)	0,62 a (0,01)	18,8 b (1,2)	69,9
	GG	0,68 a (0,04)	0,54 ab (0,02)	22,5 ab (2,7)	69,9
	PE	0,74 a (0,01)	0,56 ab (0,02)	30,2 ab (0,15)	60,8
	LBG	0,73 a (0,02)	0,49 b (0,02)	34,5 a (2,4)	55,8
	LBG+GX	0,75 a (0,00)	0,57 ab (0,02)	26,6 ab (0,05)	67,6
	C	0,72 a (0,01)	0,52 a (0,01)	32,2 a (2,9)	68,1
1,5%	GX	0,74 a (0,01)	0,46 b (0,01)	24,8 b (0,16)	68,2
	GG	0,72 a (0,00)	0,53 a (0,00)	29,6 a (0,08)	73,8
	PE	0,74 a (0,01)	0,55 a (0,01)	28,70 a (0,04)	64,8
	LBG	0,72 a (0,05)	0,52 ab (0,00)	30,9 a (1,1)	65,5
	LBG+GX	0,74 a (0,02)	0,52 ab (0,02)	25,7 b (1,7)	71,0

Dentro de cada nivel de goma (incluyendo el control) las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) Entre paréntesis se muestra la desviación estándar

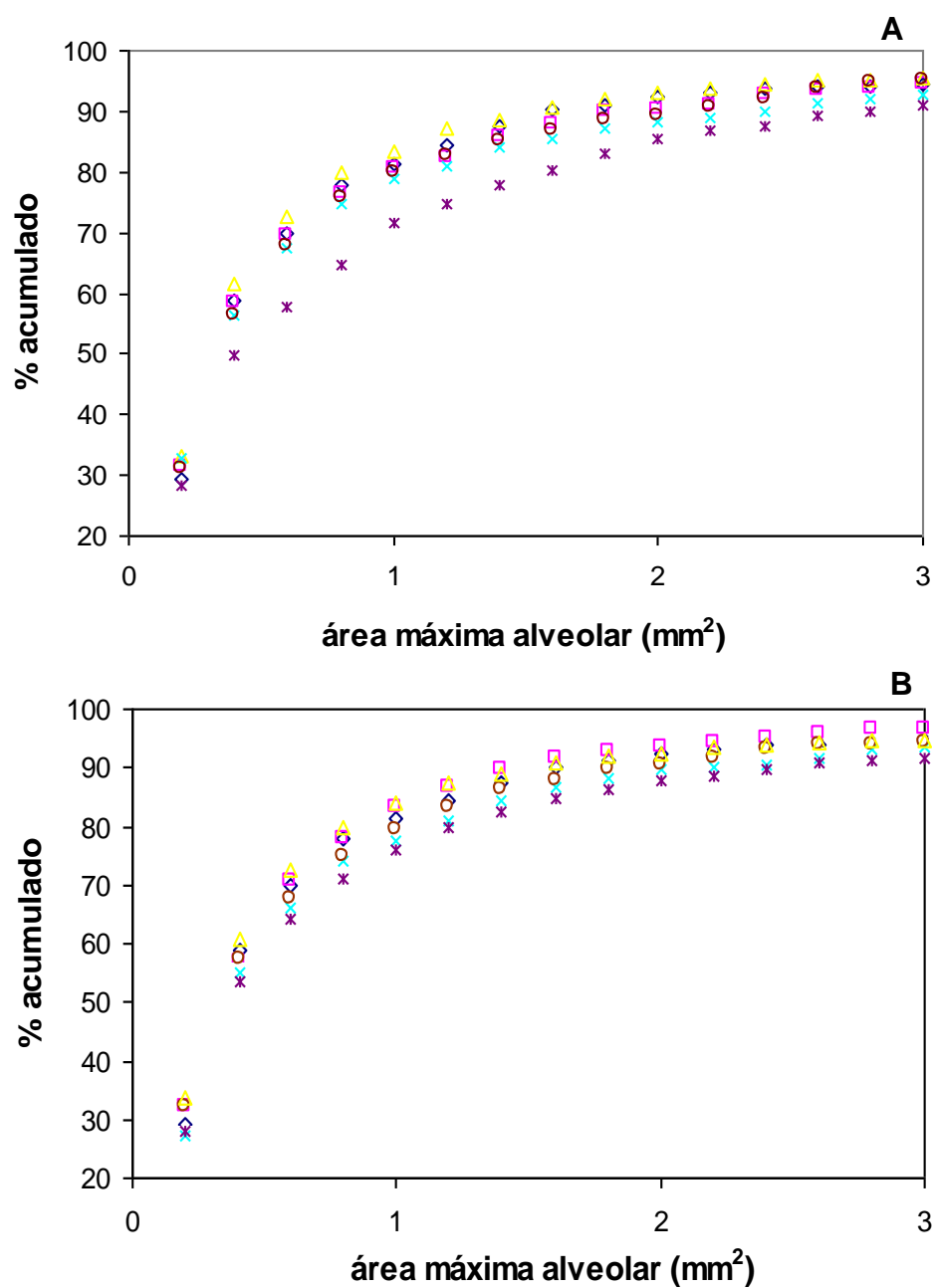


Figura 4.10 Porcentaje acumulado de alveolos en función del área alveolar hasta un máximo de 3 mm². A) 0,5% de hidrocoloides; B) 1,5% de hidrocoloide. Azul, Control; fucsia GX; amarillo GG; celeste PE; violeta LBG y marrón LBG+GX.

Comparando los resultados de volumen específico con los parámetros estadísticos de la miga se observa que con 1,5 % de goma se obtuvieron volúmenes específicos similares al control, con una tendencia a mayores volúmenes para GG, PE y LBG y menores volúmenes para GX y LBG+GX.

Esto coincide con un menor tamaño medio alveolar para GX y LBG+GX y en particular con la fracción de área más baja para el caso de LBG+GX. Con menor concentración de hidrocoloide se obtienen menores volúmenes específicos de pan, salvo para PE.

Estos menores volúmenes coinciden en general, con menores fracciones de área ocupadas por los alvéolos y una menor densidad alveolar pero no se detectó una diferencia que explique el mayor volumen específico obtenido con la PE.

4.4.7 Correlación de resultados

Se analizó a través de una matriz de correlación de Pearson las relaciones entre las distintas variables que mejor describen el alveolado de la miga y presentan diferencias entre las muestras (fracción de área, % acumulativo) con otros atributos de las piezas como el volumen específico de los panes y los parámetros de textura de la miga.

Para un nivel de hidrocoloide de 0,5% no se encontraron correlaciones que fueran significativas ($p < 0,05\%$) entre los parámetros mencionados. Para muestras con 1,5% de hidrocoloide los resultados se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Coeficiente de correlación de Pearson para los panes con 1,5% de hidrocoloide.

1,5%	% Area	% Acumulativo	Volumen específico	Dureza	Cohesividad	Resiliencia	Masticabilidad
% Area	1						
% acumulativo	0,143	1					
Volumen específico	0,850	-0,161	1				
Dureza	0,198	0,680	0,024	1			
Cohesividad	-0,736	0,450	-0,656	0,421	1		
Resiliencia	-0,863	-0,125	-0,525	0,001	0,816	1	
Masticabilidad	0,277	0,645	0,172	0,981	0,369	-0,009	1

Los cuadros sombreados indican una correlación significativa ($p < 0,05$).

Se observó una correlación positiva entre la fracción de área alveolar y el volumen específico (0,850) y negativa con la resiliencia (-0,863). En el primer caso es explicable que una miga más aireada implique un mayor volumen específico, sin embargo no se encontró una correlación significativa entre dureza y volumen específico. Esto significa que el mayor volumen de los panes no sería el único factor que influye en la textura; la interacción proteína-hidrocoloide que varía según la estructura del hidrocoloide como se vio en el Capítulo 3, también puede estar incidiendo en las características de las paredes alveolares y por lo tanto en la dureza de la miga. Este fenómeno ya fue descrito previamente por Attenburrow y col (1989).

Se encontraron otras correlaciones entre parámetros texturales, lo que era esperable ya que son parámetros texturales relacionados, como la correlación positiva entre dureza y masticabilidad (0,981) y entre cohesividad y resiliencia (0,816).

4.4.8 Almacenamiento de los panes

4.4.8.1 Humedad de la miga

Uno de los principales factores que inciden en el envejecimiento del pan es la redistribución del agua durante el almacenamiento; esto sucede por un aumento del contenido de humedad en la corteza producida por la migración del agua desde miga a la superficie o debido a la humedad de la atmósfera adsorbida sobre la corteza (Primo y col., 2006).

En la Tabla 4.5 se muestran los valores obtenidos de humedad de la miga de pan para tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C) de 1 día y 3 días.

Para la concentración 0,5% no se obtuvieron diferencias significativas tanto en el día 1 de almacenamiento como en el día 3 para las diferentes migas.

En general se observó una mayor retención de humedad durante el almacenamiento en los panes preparados en la concentración 1,5%. Para las muestras con LBG y LBG+GX se detectó un contenido de humedad significativamente mayor que para C en el día 1 de almacenamiento. En el día 3 se observó que la humedad resultó mayor que C para todos los casos excepto para PE, que presentó un valor igual a C. Estos resultados sugieren que hay, al menos en la concentración más alta de hidrocoloide, un efecto de preservación de la humedad en miga. La presencia de hidrocoloide en los panes permitiría así retener agua por más tiempo, y por lo tanto alargar su vida útil.

Estos resultados presentan la misma tendencia con lo hallado por otros autores. En ensayos de panificación realizados por Guarda y col. (2004), con el agregado de los hidrocoloides K-carragenano, goma xántica, alginato y HPMC, observaron que en general los panes mostraron una menor pérdida en el contenido de humedad durante el almacenamiento, lo que implica una mayor retención de humedad en la miga. K-carragenano fue el hidrocoloide con menor capacidad de retención de agua, mientras que alginato y goma xántica fueron

los que presentaron mayor retención de humedad, ambos en las concentraciones 0,1 y 0,5%.

Correa y col. (2011) informaron que en panes hechos con 2% de pectinas de bajo metoxilo, almacenados durante 3 días a temperatura ambiente, la humedad disminuyó en un 14,3%, valor similar al obtenido con el control (14,5%) mientras que la pérdida con pectina de alto metoxilo fue menor (10,9%).

Tabla 4.5 Humedad de la miga durante el almacenamiento.

		C	GX	GG	PE	LBG	LBG+GX
0,5%	Día 0	43,9 a (0,2)	44,3 a (0,5)	42,7 b (0,3)	43,5 a (0,7)	44,5 a (1,9)	44,3 a (0,5)
	Día 1	41,8 ab (1,3)	42,5 a (0,5)	41,3 a (0,8)	41,8 ab (0,8)	42,5 ab (1,0)	42,8 a (0,5)
	Día 3	38,7 a (1,6)	39,4 a (1,1)	38,9 a (1,2)	37,7 a (0,9)	39,4 a (0,9)	39,3 a (0,7)
1,5%	Día 0	43,9 d (0,2)	45,7 b (0,2)	44,5 d (0,3)	44,6 c (0,1)	45,7 b (0,1)	46,2 a (0,0)
	Día 1	41,8 cd (0,3)	40,2 c (0,2)	43,1 c (0,7)	42,6 d (0,5)	44,7 a (0,4)	45,4 b (0,4)
	Día 3	38,7 c (1,6)	41,5 ab (0,9)	40,4 b (0,5)	39,2 c (0,3)	41,9 a (0,7)	41,9 a (0,8)

Letras diferentes dentro de cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).
Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

4.4.8.2 Textura de la miga

En la Figura 4.11 se representa el porcentaje de variación (respecto al pan recién horneado-día 0) de la dureza de la miga durante el periodo de almacenamiento. Como era de esperar, se observa que el incremento porcentual en el día 3 de almacenamiento respecto al día 0 resultó mayor que para el día 1 en todos los casos. Sin embargo, con la máxima concentración de LBG y GG el incremento fue significativamente menor que el observado para el control sin goma C.

Guarda y col. (2004) observaron un mayor incremento en la dureza con los panes que tenían GX y k-carragenano y un incremento menor con HPMC y alginato describiéndolos como mejores agentes para retardar el envejecimiento del pan. En panes preparados con HPMC y alginato, almacenados durante 24 horas, se observó un efecto protector del hidrocoloide que impidió que la dureza de la miga aumentara tanto como en el control. Los autores atribuyeron este efecto a la capacidad de retención de agua de los hidrocoloides y a una posible inhibición de la retrogradación por interacción entre el hidrocoloide y el almidón (Guarda y col. 2004). Otros autores (Shalini y Laxmi, 2007) encontraron que la presencia de GG produjo también un efecto favorable durante el almacenamiento disminuyendo el endurecimiento de la miga.

Se ha informado (Kohajdová y col. 2009) que ciertos hidrocoloides como la goma xántica (GX) producen un aumento de la cohesión entre gránulos de almidón, proporcionando así una mayor estructura a los productos panificados. Sin embargo, en el presente trabajo, la cohesividad (Figura 4.12) disminuyó con el almacenamiento (de allí una variación negativa) y no se observó un efecto mejorador respecto al control al agregar hidrocoloide en ninguno de los dos niveles.

La resiliencia (Figura 4.13), vinculada con la recuperación instantánea frente a una deformación resultó afectada en el mismo sentido que la cohesividad, por el almacenamiento, es decir disminuyó con el tiempo, no observándose efecto mejorador con los hidrocoloides.

La masticabilidad, parámetro vinculado a la dureza y la cohesividad aumentó con el tiempo de almacenamiento; pero no se modificó con la presencia de los hidrocoloides al 0,5% (Figura 4.14). Sin embargo al aumentar a 1,5% se verificó en general un menor incremento respecto al control en el tercer día, específicamente con GG.

En panes hechos con pectinas de alto y bajo metoxilo (Correa y col. (2011), la resiliencia y la cohesividad también disminuyeron con el tiempo de almacenamiento, sin embargo los valores de masticabilidad en muestras con

pectinas de alto metoxilo luego del período de 3 días fueron similares a los de panes frescos, lo que indica un efecto protector de este hidrocoloide.

A pesar de los efectos beneficiosos encontrados en este trabajo e informados también por otros autores, existen controversias respecto al uso de algunos hidrocoloides. Mandala y col. (2005) obtuvieron con GG un producto con menos propiedades deseables, ya que disminuyó el volumen específico y porosidad de pan, y se produjo una corteza gomosa de bajo espesor.

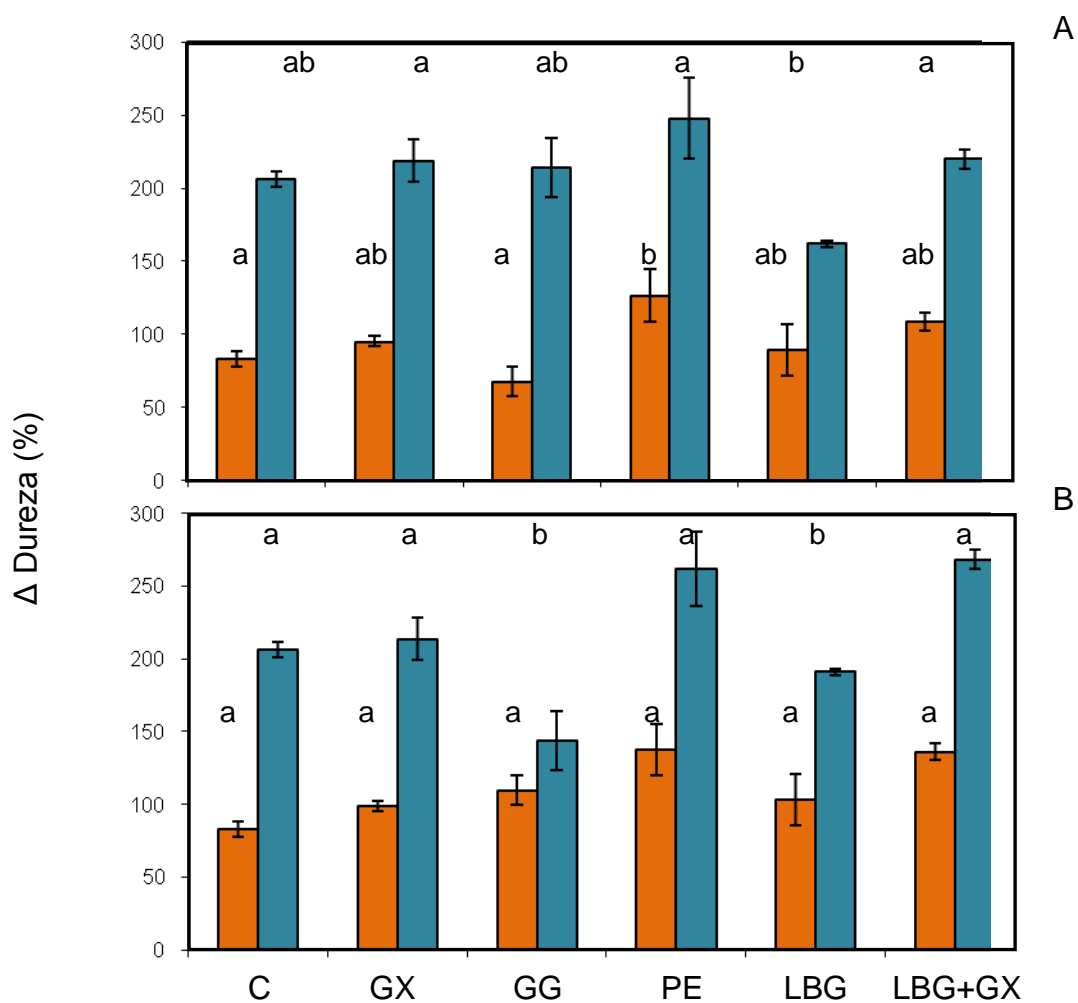


Figura 4.11 Variación de la dureza de la miga durante el período de almacenamiento, con 0,5% (A) y 1,5% (B) de hidrocoloide; anaranjado, día 1; azul, día 3 de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma serie ($p < 0,05$)

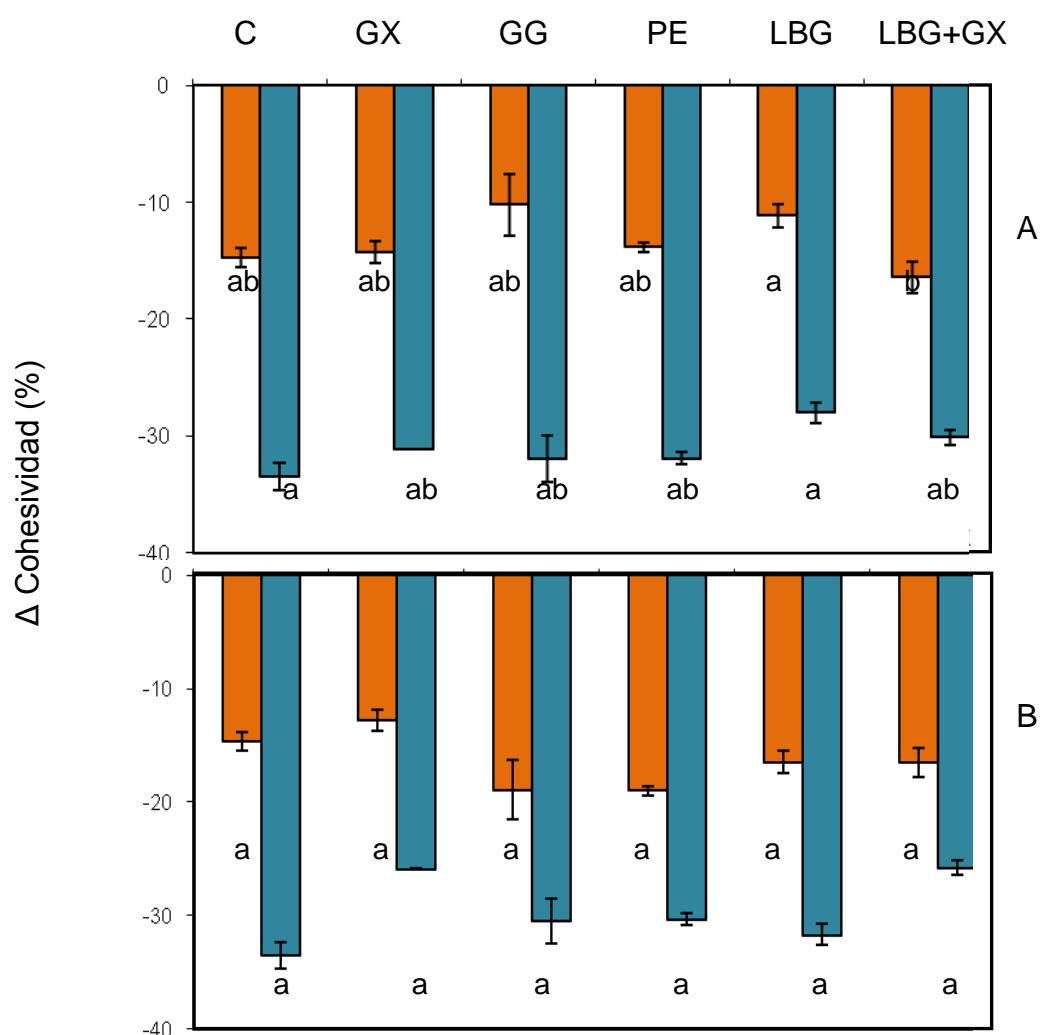


Figura 4.12 Variación de la cohesividad de la miga durante el período de almacenamiento, con 0,5% (A) y 1,5% (B) de hidrocoloide; anaranjado, día 1; azul, día 3 de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma serie ($p < 0,05$)

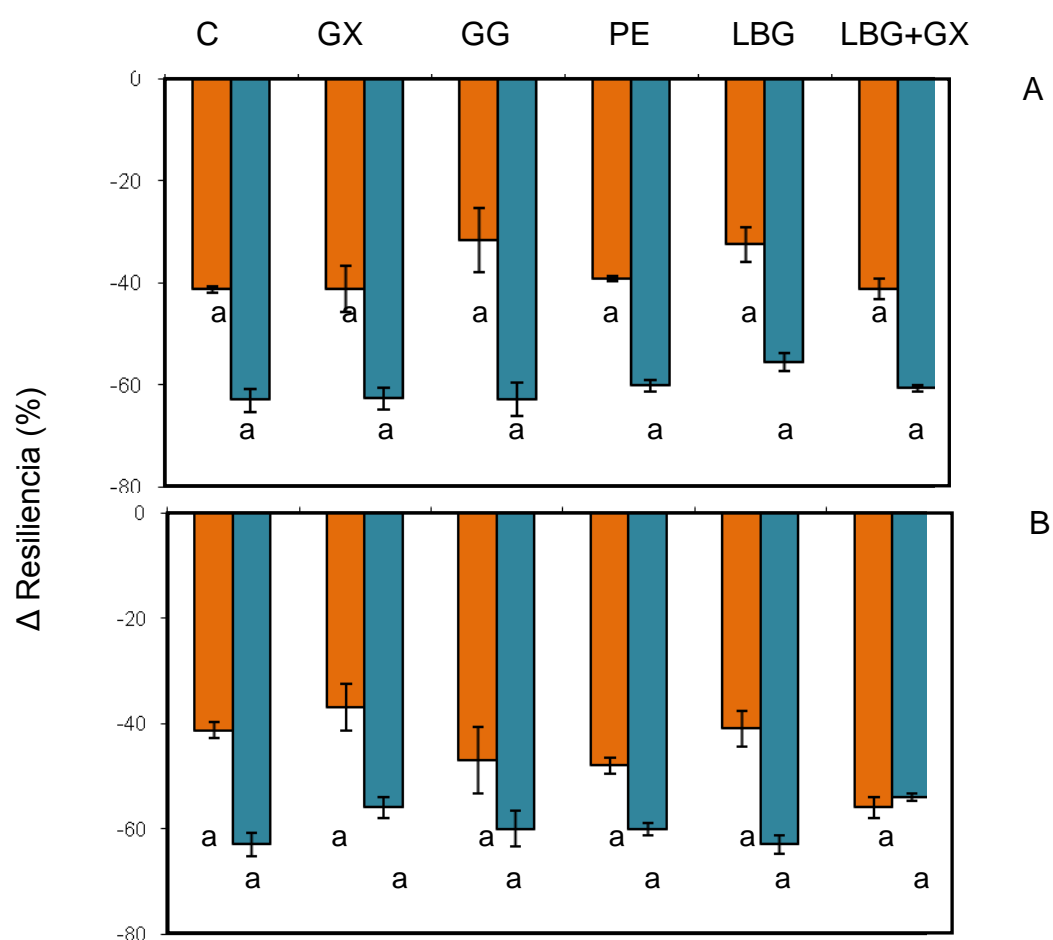


Figura 4.13 Variación de la resiliencia de la miga durante el período de almacenamiento, con 0,5% (A) y 1,5% (B) de hidrocoloide; anaranjado, día 1; azul, día 3 de almacenamiento.

Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma serie ($p < 0,05$)

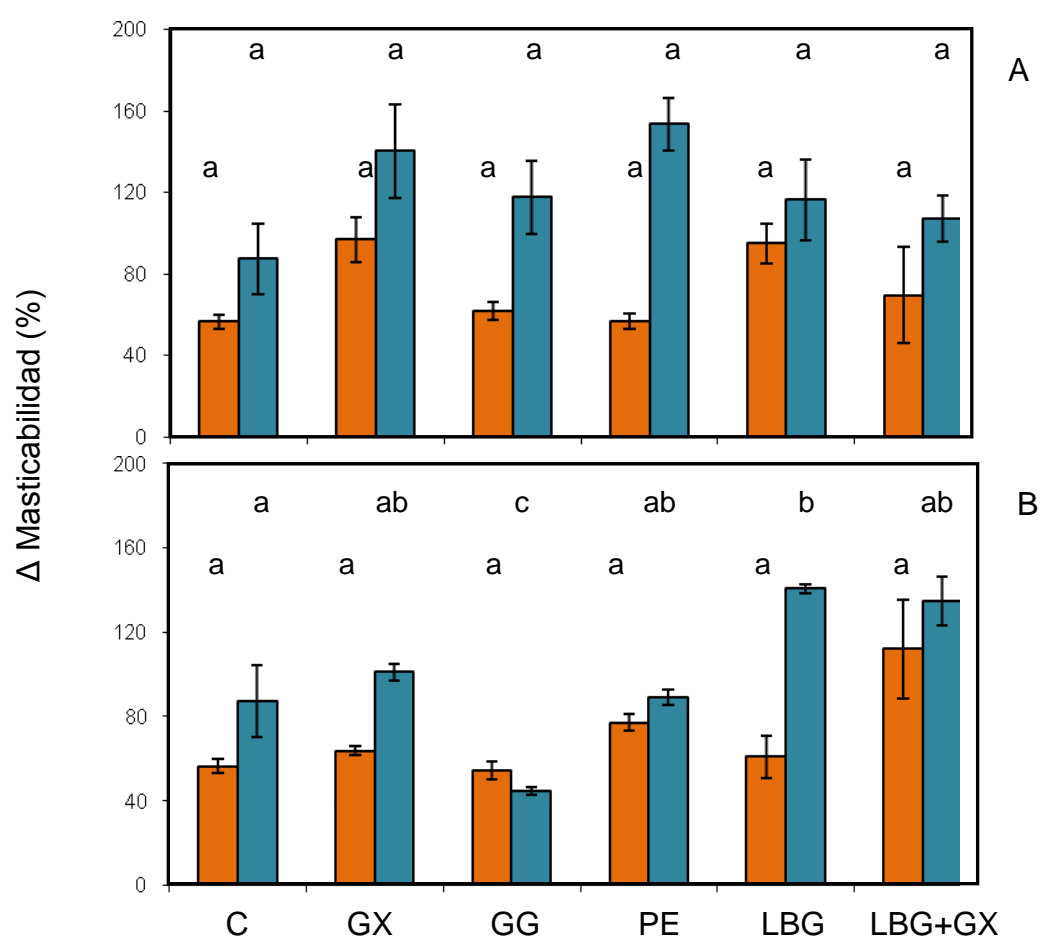


Figura 4.14 Variación de la masticabilidad de la miga durante el período de almacenamiento, con 0,5% (A) y 1,5% (B) de hidrocoloide; anaranjado, día 1; azul, día 3 de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma serie ($p < 0,05$)

4.4.8.3 Retrogradación de amilopectina

En la Figura 4.15 se muestran, a modo de ejemplo, los termogramas obtenidos para las muestras control C y las muestras con GG a los tiempos 0, 3 y 7 días de almacenamiento. Se observa la ausencia, a tiempo 0, de eventos endotérmicos. Las endotermas, correspondientes a la fusión de los cristales de amilopectina formados durante el almacenamiento (3 y 7 días) estuvieron en todos los casos en un rango de 50 a 80°C.

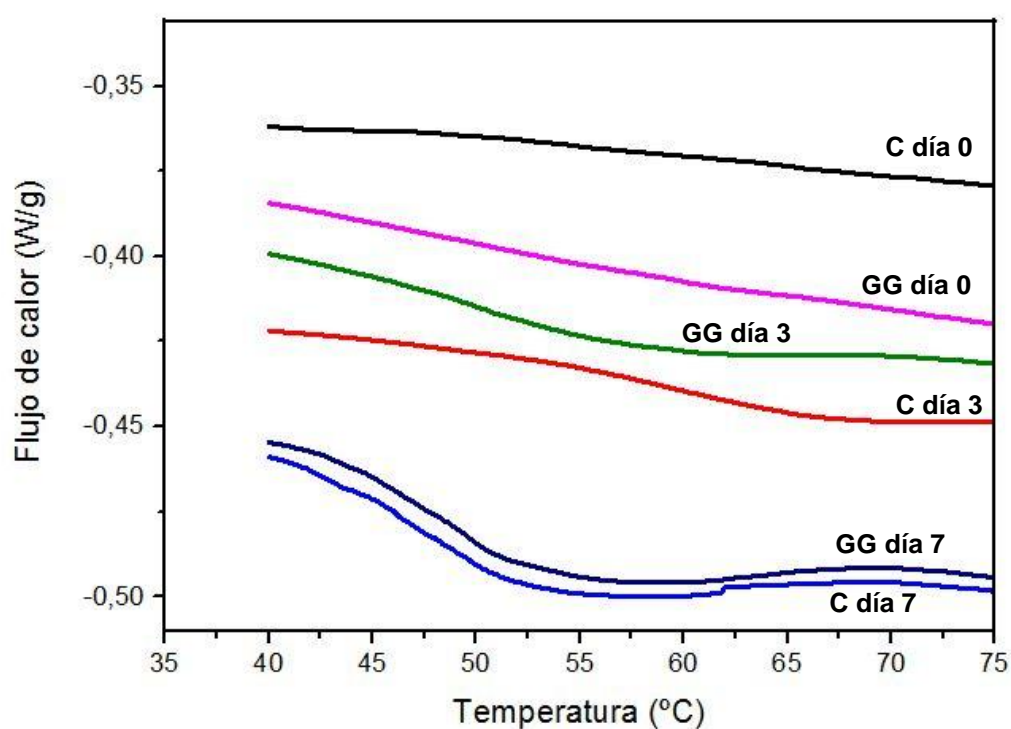


Figura 4.15 Curvas de retrogradación de la amilopectina de los panes almacenados. C: control, GG: goma guar. Tiempos: 0, 3 y 7 días.

En la Tabla 4.6 se muestran los parámetros obtenidos a partir de los termogramas después de 3 y 7 días de almacenamiento de panes con 1,5 % de hidrocoloide.

Respecto a las temperaturas, si bien no se observaron diferencias significativas, se ve en general una tendencia a menores valores de TPI y Tf en el día 7 respecto al día 3. Para cada tiempo de almacenamiento, el ANOVA y la comparación de medias de las temperaturas indicó que no hubo diferencia significativa respecto al control entre las diferentes muestras.

Respecto de las entalpías, en el día 7 se observaron, en general, entalpías mayores que en el día 3. En el día 3 de almacenamiento se observó un aumento significativo en las entalpías de retrogradación en el caso de GG y LBG+GX respecto a C. En el día 7 las entalpías fueron significativamente mayores que las del control para LBG+GX y significativamente menores que el control para GX y PE. En los casos de GG y LBG no se observaron diferencias significativas respecto a C. De esto se concluye que en las muestras con GX y PE las condiciones del entorno ejercen una cierta inhibición sobre la retrogradación de la amilopectina, probablemente por una distribución distinta del agua en estas matrices que podría impedir su difusión. Existen resultados controversiales en literatura respecto al efecto específico de cada hidrocoloide, lo que puede deberse, como se explicara anteriormente al nivel de hidrocoloide utilizado, tipo de formulación y variables de proceso de panificación (como cocción). Gavilighi y col. (2006) informaron en panes con 1% de hidrocoloide, mayores entalpías para las muestras control y con LBG y menores para muestras con GG. Por otro lado, Davidou y col. (1996) informaron que durante el almacenamiento de panes, tanto el grado de firmeza de la miga como la velocidad de su incremento durante el almacenamiento se redujeron por la adición de LBG (1% en base harina), alginato y GX (0,5 % en base harina).

Tabla 4.6 Temperaturas inicial (Ti), de pico (TPI), final (Tf) y entalpías (ΔH) de retrogradación del almidón.

tiempo	goma	Ti (°C)	TPI (°C)	Tf (°C)	ΔH (J/g)
Día 3	C	52,3a (1,7)	64,3a (1,6)	80,6a (0,0)	2,04 bc (0,00)
	GX	53,1a (1,4)	62,1a (1,5)	75,0a (2,4)	1,84 c (0,08)
	GG	51,7a (0,6)	62,0a (0,2)	76,9a (1,8)	3,22 a (0,03)
	PE	51,7a (0,8)	62,9a (0,2)	76,9a (1,7)	2,29 c (0,22)
	LBG	49,2a (1,1)	62,4a (0,8)	77,9a (2,9)	2,63 b (0,00)
	LBG+GX	49,5a (1,5)	61,9a (0,7)	79,7a (1,4)	3,10 a (0,20)
Día 7	C	49,8a (1,5)	58,9a (1,7)	76,7a (0,7)	5,39 b (0,74)
	GX	50,8a (1,6)	59,5a (0,5)	77,2a (0,9)	3,83 c (1,12)
	GG	48,9a (2,0)	59,2a (0,7)	74,7a (0,5)	6,20 b (0,60)
	PE	51,7a (0,1)	59,2a (0,1)	77,4a (0,6)	3,39 c (0,27)
	LBG	50,1a (0,6)	59,7a (0,7)	76,7a (0,9)	6,01 b (0,75)
	LBG+GX	49,7a (1,4)	59,5a (0,8)	74,8a (1,0)	8,06 a (0,03)

Dentro de cada día de almacenamiento y en cada columna letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Estos resultados revelan que ciertos hidrocoloides podrían retrasar o inhibir parcialmente la retrogradación de amilopectina. Dado que la amilopectina retrograda dentro de la estructura granular remanente de la gelatinización, el mecanismo por el cual los hidrocoloides interfieren en la retrogradación de amilopectina podría estar relacionado con la capacidad de migración del agua durante el almacenamiento. La retrogradación es una cristalización y como fenómeno con control difusional, requiere de cierta movilidad del agua de la matriz para ocurrir. La capacidad mayor o menor de los hidrocoloide de retener

agua, de acuerdo a su distinta estructura, puede ser un factor importante. Por otro lado, las interacciones que puede establecer el hidrocoloide con el gluten, conduciendo a conformaciones de red diferentes de la original también podría incidir en una mayor o menor movilidad.

4.5 Conclusiones parciales

El agregado de hidrocoloides puede tener un efecto positivo en las distintas etapas de panificación y en la calidad del producto final, de acuerdo al tipo y nivel utilizado.

En la fermentación, GG, PE y LBG mostraron un aumento del volumen máximo, parámetro importante dado que determinará el volumen final de la pieza en la cocción.

El volumen de pan no resultó afectado en forma significativa por la presencia de gomas pero sí se observó una tendencia a aumentar el volumen al adicionar PE.

El color de la corteza fue diferente al control cuando se agregaron algunos hidrocoloides. Con GG se observó una mayor pardeamiento y con LBG+GX se obtuvieron cortezas menos rojizas.

Los atributos de textura de la miga se vieron afectados positivamente con algunos hidrocoloides. PE y LBG generaron migas más blandas. GX aumentó la cohesividad en el nivel más alto y la resiliencia en ambos niveles. El análisis del alveolado de la miga mostró que algunos hidrocoloides pueden tener cierto efecto sobre la distribución de tamaño de alveolos; en el caso de GG y LBG+GX se observó una mayor predominancia de alvéolos pequeños mientras que para PE y LBG hubo una tendencia a alvéolos más grandes, aunque en estos últimos casos la fracción de área fue similar a la del control. Con GX la fracción de área alveolar fue significativamente menor en ambos niveles.

Algunos hidrocoloides tuvieron un efecto positivo sobre la calidad del pan durante el almacenamiento al actuar como agentes de retención de la humedad

(LBG y LBG+GX) y en algunos casos se observó un efecto beneficioso en la textura de miga, mitigando el endurecimiento de la misma (con GG y LBG).



Capítulo 5

Conclusiones Generales

5.1 Conclusiones Generales

Absorción de agua

Los hidrocoloides tienen un efecto significativo sobre la absorción de agua de la formulación. Las mezclas de harina con GX y LBG+GX tuvieron los mayores valores de absorción de agua, en todos los ensayos: absorción farinografica, WIC, IS-SDS y SRC sacarosa. Esta capacidad de los hidrocoloides se ve reflejada también en su comportamiento en solución, presentando las soluciones con GX y LBG+GX y en menor medida la de GG las mayores viscosidades aparentes.

Características reológicas de la masa

La estabilidad farinográfica dependió del tipo de hidrocoloide incorporado; las mezclas con el agregado de GG llevaron a una masa más estable, la adición de GX no marcó un cambio importante en este atributo y las masas con PE resultaron menos estables.

El nivel de agua es un factor determinante en los atributos texturales de la masa; cuando se agrega agua en cantidad suficiente, se observan mayores variaciones en las características texturales.

De acuerdo al análisis de perfil de textura se obtuvieron masas más blandas y menos cohesivas con el agregado de hidrocoloide en la mayoría de los casos. Mientras que bajo condiciones de restricción de agua se obtuvieron masas más consistentes con el agregado de GX y GG en los niveles más altos.

Microestructura de la masa

Las micrografías de masa (SEM) mostraron diferencias en la integridad de la red cuando se agregaban hidrocoloides, particularmente en el nivel más alto. Los hidrocoloides condujeron en general a redes más disgregadas aun en condiciones óptimas de hidratación.

Los análisis microestructurales mostraron que los hidrocoloides afectan la conformación de la red de gluten; las proteínas resultaron más desplegadas observándose una disminución de la conformación α -hélice, además de cambios en la conformación de los enlaces disulfuro. Asimismo los hidrocoloides, produjeron un cambio de la labilidad de las proteínas de la red, pudiendo ser extraídas más subunidades que no están vinculadas a través de uniones covalentes.

La matriz (gluten-hidrocoloide-agua) que se forma en cada caso puede ser más o menos rígida, lo que se refleja en la movilidad molecular. Una mayor movilidad se encontró en las matrices que contenían goma xántica (GX), sugiriendo una red más flexible. Por otro lado, el agregado de pectina (PE) conduciría a la formación de una red de gluten más desordenada pero bastante rígida.

El análisis electroforético permitió evaluar la mayor o menor interacción de las subunidades proteicas dentro de la red. En el caso de PE, la interacción con la proteína condujo a una matriz más lábil, observándose mayor extracción de subunidades proteicas, las que aparecen en el perfil electroforético. Con otros hidrocoloides, como la GG, no se observó este fenómeno

Atributos de calidad del producto panificado

En el pan fresco, el principal atributo de calidad, el volumen de pan no resultó afectado pero si el color de la corteza que fue diferente al control en algunos casos (GX, LBG+GX).

Respecto a la calidad de miga, se obtuvieron migas más blandas con PE. El análisis del alveolado de la miga mostró que algunos hidrocoloides pueden tener cierto efecto sobre la distribución de tamaños pero no se llegó a afectar el área media alveolar.

Algunos hidrocoloides tuvieron un efecto positivo sobre la calidad del pan durante el almacenamiento al actuar como agentes de retención de la humedad (LBG y

LBG+GX). Sin embargo, además del efecto de retención de humedad, la interacción específica con los otros componentes de la masa parece contribuir a cierto efecto protector durante el almacenamiento, particularmente en el caso de la GG, al disminuir el endurecimiento de la misma.

Las diferentes características estructurales y físicas de los hidrocoloides influyen en el grado y tipo de interacción entre éstos y los componentes de la masa, particularmente la red de gluten. Estas interacciones también son afectadas por otros factores como, la presencia de NaCl y la disponibilidad de agua. Producto de dichas interacciones se modifican tanto las características reológicas de la masa como los atributos del producto obtenido, en algunos casos favorablemente.



Bibliografía

Bibliografía

- AACC International (2000). Métodos: 08-01; 30-25.01; 54.30.02, 22-08.01; 38-12, 44-19; 76-21; 56.81. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed. St. Paul, MN: The American Association of Cereal Chemist, Inc.
- *Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de salud Pública. Normativa de alimentos.*
www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Ley_25630
- Alaedini A., Latov N. 2006. Transglutaminase-independent binding of gliadin to intestinal brush border membrane and GM1 ganglioside J. Neuroimmunology 177, 167-172
- Anderson O.D.; Hsia C.C.; Adalsteins A.E.; Lew, E.J.-L.; Kasarda, DD. 2001. Identification of several new cases of low molecular weight wheat gliadin related proteins and genes. *Theor Appl Genet*, 103, 307-315.
- Anonymous.1985. Reference Source. Ingredients Characteristics (Section II) Baker's Digest 59(4): 26
- Armero, E.; Collar, C. 1998. Crumb firming kinetics of wheat breads with antistaling additives. *Journal of Cereal Science*. 28, 165-174.
- Azizi, M.H. Rao, G.V. 2003. Effect of surfactant gel and gum combinations on dough rheological characteristics and quality of bread. *Journal of Food Quality*. 27:320-336
- Bárcenas M.E. Rosell C.M. 2006. Different approaches for improving the quality and extending the shelf life of the partially baked bread: low temperatures and HPMC addition. *J. Food Eng*. 72, 92-99.

- Bárcenas, M.E. De la O-Keller, J. Rosell, C.M. 2009. Influence of different hydrocolloids on major wheat dough components (gluten and starch). *J. Food Eng* 94, 241-247.

- Baumann, H. 1967. Apparatur nach Baumann zur Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahme von pulvrigen Substanzen. *Glastechnik und Instrumentechnik Fachzeitschrift für das Laboratorium* 11: 540-542.

- Berton, B. Scher, J. Villieras, F. Hardy, J. 2002. Measurement of hydration capacity of wheat flour: influence of composition and physical characteristics. *Powder Technol* 28: 326-331

- Belitz H.D. y Grosch W. 1988. Química de los alimentos [Ciencia y tecnología de los alimentos](#). Ed. Acribia.

- Bettge A.D., Morris C.F. 2000. Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry* 77 (2): 241-247.

- Bietz J.A., Hueber F.R., Sanderson J.E. Wall J.S. 1977. Wheat gliadin homology revealed through N-terminal amino acid sequence analysis. *Cereal Chem.* 54: 1070-1083.

- Biliaderis C.G. Page C.M. Maurice T.J. Juliano B.O. 1986. Thermal characterization of rice starches: A polymeric approach to phase transitions of granular starch. *J. Agric. Food Chem.* 34: 6-14

- Biliaderis C.G. 1991. Non-equilibrium phase transitions of aqueous starch systems. In *Water relationships in Food*, Ed. H. Levine and L. Slade. Plenum Press, NY, pp. 251-273.

- Biliaderis C.G. 1992. Structures and Phase Transitions of Starch in Food Systems. *Food Technol.*, 6, 98-109.

- Bourne MC, Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. Academic Press, 2002.

- Buera M.P. Retriella C. Lozano R.D. (1985). Definition of colour in the non-enzymatic browning. *Die Farbe* 33: 316-326.
- Buléon A. Colonna P. Planchot V. Ball, S. Starch Granules: structure and biosynthesis; *International Journals of Biological Macromolecules*.1998. 23, 85:112.
- Campos D.T. Steffe, J.F. 1997. Rheological behavior of undeveloped and developed wheat dough. *Cereal Chem.* 74, 489-494.
- Carey P.R. 1982. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies, Eds. B. Horecker, N.O. Kaplan, J. Marmur, H.A. Scheraga, Academic Press: New York, NY.
- Challen, A. "Xanthan Gum: A Multifunctional Stabilizer for Food Product". *Food Hydrocolloids: structure, properties and functions*. P 135-200. 1992. Plenum Press, New York. Edited by Nishinari, K; Doi, E.
- Carr N.O. Daniels N.W.R. Frazier P.J. 1992. Lipid interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 31: 237-258.
- Chen P.L. Long Z. Ruan R. Labuza T.P.1997. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Water Mobility in Bread during Storage. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*, 30, 173-183.
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, Capítulo IX, Harinas artículo 657
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, Capítulo IX, Harinas, Artículo 661 .Res. 167, 26.1.82
- Collar C. Andreu P. Martínez J. C. Armero E. 1999. Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. *Food Hydrocoll.* 13: 467-475.

- Collar C. Armero E. Martínez J. 1998. Lipid binding of formula bread doughs: Relationships with dough and bread technological performance. *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 207: 110-121.
- Cornec M. Popineau Y. & Lefebvre J. 1994. Characterization of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *Journal of Cereal Science*, 19, 131-139.
- Coulter J M. Practical Science. 1910. Science. New Series. Vol 31. 806:881-889.
- Courtin C.M. Roelants A. Delcour J.A. 1999. Fractionation reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1870-1877
- Courtin C.M. Delcour J.A. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35:225-243
- Cauvain S.P. Young L.S. 1998 en *Fabricacion de pan*. Acribia Zaragoza, España.
- Correa, M.J. Pérez G.T. Ferrero C. 2011. Pectins as Breadmaking Additives: Effect on Dough Rheology and Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*. DOI: 10.1007/s11947-011-0631-6 (2011).
- Cuq B. Abecassis J. Guilbert S. 2003. State diagrams to help describe wheat bread processing. *International Journal of Food Science and Technology*. 38, 759-766.
- Davidou S. Le Meste M. Debever E. and Bekaert D.A. 1996 Contribution to the study of staling of white bread:effect of water and hydrocolloid. *Food Hydrocolloids* 10 375–383.

- Dick J. Quick J. 1983. A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early-generation durum wheat breeding lines. *Cereal Chem.* 60: 315-318.
- Eckert B. Amend T. Belitz H. D. 1993. The course of the SDS and Zeleny sedimentation test for gluten quality and related phenomena studied using the light microscope. *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 196:122-125
- Eliasson A. C. Hegg P.O .1980. Thermal Stability of Wheat Gluten. *Cereal Chem* 57:436-437
- Eliasson A.C. Larsson K. 1993. *Cereals in Breadmaking*. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong
- Encinar Hidalgo, J.A. Personal Website. <http://shaker.umh.es> (acceso: febrero 2014)
- Engelsen S.B. Jensen M.K. Pedersen H.T. Norgaard L. and Munck L. 2001. NMR-baking and Multivariate Prediction of Instrumental Texture Parameters in Bread. *J. Cereal Sci.*, 33, 59-69.
- Esselink E. van Aalst H. Maliepaard M. Hnederson T.M.H. Hoekstra N.L.L. and van Duynhoven J. 2003. Impact of Industrial Dough Processing on Structure: A Rheology, Nuclear Magnetic Resonance, and Electron Microscopy Study. *Cereal Chem.* 80, 419-423.
- Evans I.D. y Haisman D.R. 1982. The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Starch* 34: 224-331.
- FAO/ Trigo. Sitio web: <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s09.htm>
- Falçao-Rodrigues, M.M. Moldão-Martins, M. y Beirão-da-Costa M.L. 2005. Thermal properties of gluten protein of two soft wheat varieties. *Food Chemistry.* 93, 459-465.

- Fennema, O. 1993. *Química de los Alimentos*. Capítulo. Zaragoza, Acribia.
- Ferrer E.G. Bosch, A. Yantorno O. Baran E.J. 2008. A Spectroscopy Approach for the Study of the Interactions of Bioactive Vanadium Species with Bovine Serum Albumin. *Bioorg. Med. Chem*, 16, 3878-3886.
- Ferrero C. Martino M.N. Zaritzky N.E. 1993. Effect of freezing rate and xanthan gum on the properties of corn starch and wheat flour . *International Journal of Food Science & Technology*. 28, 5, pag 481–498.
- Ferrero C. Martino M.N. Zaritzky N.E. 1996. Effect of hydrocolloids on starch thermal transitions, as measured by DSC. *J. Therm. Anal.*, 47, 1247-1266
- Ferrero C. Martino M. N. Zaritzky N. E. 1994 Corn Starch-Xanthan Gum Interaction and Its Effect on the Stability During Storage of Frozen Gelatinized Suspension. *Starch* [46, 8](#), pag. 300–308.
- French D. *Starch Chemistry and Technology*; Chapter VII- Organization of Starch Granules. P 42.1984. Academy Press- Orlando Florida. Edited by Whistler. Bemiller. J; Paschall, E.
- Galal A.M. Varriano-Marston E. Jhonson J.A. 1978. Rheological dough properties as affected by organic acids and salt. *Cereal Chem*. 55: 683-691.
- Gan Z Ellis P.R. Schofield J.D. 1995. Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21: 215-230
- Gianuzzi L. En *La Revista de la Cooperadora del Hospital de Niños*. 2009. Año 11 N° 75. Pag. 9-14
- Glicksman M. 1982. En M. Glicksman (Ed) *Food Hydrocolloids*. Vol I Boca Raton: CRC Press, Inc

- Goesaert H. Brijs H. Veraverbeke K. Courtin W.S. Gebruers C.M K y Delcour J.A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality en Food Science & Technology 16. 12–30.
- Gómez M. Ronda F. Caballero P.A. Blanco C.A. y Rosell M.C. 2006. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes.
- Gómez Pallares M. León A. E. Rosell M. C. Trigo en “De tales harinas tales panes” 2007 pag 19-62 Editado por León, A.E y Rosell, C.M., Báez ediciones.
- Gray J.A. Bemiller J.N. Bread Staling: 2003. Molecular Basis and Control. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2:1- 121.
- Greenwood C. 1976. Starch. En: Advances in Cereal Science and Technology, Vol. 1. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereals Chemists. USA. 119-157.
- Grosch W. Wieser H. 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. Journal of Cereal Science, 29: 1-16
- Guarda A. Rosell C. M. Benedito C. Galotto M.J. 2004. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. Food Hydrocoll. 18: 241-247.
- Gunning A.P. Bongaerts R.J.M. & Morris V.J. 2008. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. FASEB Journal doi: 10.1096/fj.08-106617.
- Guttieri M. J. Bowen D. Gannon D. O'Brien K. Souza E. 2001. Solvent Retention Capacities of Irrigated Soft White Spring Wheat Flours. Crop Sci. 41: 1054-1061.
- He H. and R.C. Hosney. 1990. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. Cereal Chem., 67: 603-605.

- Herrera M.L. M'Cann J.I. Ferrero, C. Hagiwara T. Zaritzky N.E. Hartel, R.W. 2007. Thermal, mechanical and molecular properties of stabilized frozen sucrose and fructose solutions. *Food Biophys*, 2, 20-28.
- Hosney R.C. 1984. Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*, 38, 114-117
- Ibanoglu E. & Ercelebi, E.A. 2007. Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 80, 454-459.
- Infoagro, sitio web : <http://www.infoagro.com/>
- Jalili T. Wildman R. Medeiros D. 2007. Dietary fiber and coronary heart disease. Pages 131-34 in: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. R. Wildman, ed. CRC Press Inc.: New York.
- [Jovanovich G.](#) [Puppo M. C.](#) [Giner S. A.](#) [Añón M. C.](#) 2003. Water uptake by dehydrated soy protein isolates: Comparison of equilibrium vapour sorption and water imbibing methods. *J. Food Eng.* 56: 331-338.
- Kent N. L; *Technology of Cereals*. Pergamon Press. 1983
- Khatkar B.S. Bell A.E. & Schofield J.D. 1995. The dynamic rheological properties of glutes and gluten subfractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 22, 29-44.
- Kim S.K. D' Appolonia B.L. 1977, a) Effect of pentosans on retrogradation of wheat starch gels. *Cereal Chemistry* 54: 150- 160.
- Kinsella J. E. Hale M. L. 1984. Hydrophobic Associations and Gluten Consistency: Effects of Specific Anions. *J. Agric. Food Chem.* 32: 1054-1056.

- Kohajdová Z. Karovičová J. Schmidt S. 2009. Significance of Emulsifiers and Hydrocolloids in Bakery Industry. *Acta Chimica Slovaca*, Vol.2, No.1, 2009, 46 – 61.

- Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* vol. 227 pp. 680-685, 1970.

- Lazaridou A. Duta D. Papageorgiou M. Belc N., Biliaderis C.G. 2007. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J. Food Eng.* 79: 1033-1047.

- **Lee M.R. Swanson B.G, Baik B.K. 2001. Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry* 78 (6):701-706.**

- Lefebvre J, Mahmoud N. 2007. The pattern of the linear viscoelastic behaviour of wheat flour dough as delineated from the effects of water content and high molecular weight glutenin subunits composition. *Journal of Cereal Science* 45 (2007) 49–58

- Leon A. Ribotta P. Ausar S. Fernandez C. Landa C. Beltramo D. 2000. Interactions of different carrageenan isoforms and flour components in breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2634–2638.

- Leung H. K. Magnuson J.A. and Bruinsma B. L. 1979. Pulsed NMR study of water mobility in flour dough. *J Food Sci*, 44: 1408-1411.
- Leung H.K. Steinberg M.P. Wei L.S. Nelson A.I. 1976. Water binding of macromolecules determined by pulsed NMR. *J. Food Sci.*, 41, 297-300.

- Lindsay M Skerritt J. 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 10:247-253

- Lopez-Da-Silva J.A. Santos D.M.J. Freitas A. Brites C. Gil A.M. 2007. Rheological and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of Hydration and Heating of Undeveloped Wheat Doughs. *J. Agric. Food Chem.*, 5636-5644.
- Lord R.C. Yu N.T. Laser-excited Raman Spectroscopy of Biomolecules II, Native ribonuclease and α -chymotrypsin, *J. Mol. Biol.*, 51.1970. 203-213
- Lusse S. Arnold K. 1998 *Water* binding of polysaccharides-NMR and ESR studies. *Macromolecules*. 31, 6891-6897.
- Lutz M. Zuleta A. 2009 Relación entre la alimentación y la salud del consumidor en Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación. Universidad de Valparaíso Chile. Pag. 17-25
- Marchant J.L. Blanshard J.M.V. 1978. Studies of the dynamics of the gelatinization of starch granules employing a small angle light scattering system. *Starch*, 30, 257-264.
- McCarthy D.F. Gallagher E. Gormley T. R. Schober T. J. Arendt E. K. 2005. Application of response surface methodology in the development of gluten-free bread *Cereal Chem.* 82: 609-615.
- Michniewicz J. Biliaderis C. G. Bushk W. 1990. Water insoluble pentosans of wheat: composition and some physical properties. *Cereal Chem.* 67: 434-439.
- Miles M.J. Morris V.J. Orford P.D. Ring, S.G. 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research* 135 (2): 271-281.
- Nieto-Taladriz, M. T. Ruiz M. Martinez M. C. Vazquez J. F. Carrillo J. M. 1997. Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 95, 1155–1160.

- Pateras I.M.C. Alteración y Envejecimiento del pan en Fabricación de pan. Zaragoza, Acribia S.A. 1998. Pag 283-305
- Payne P.I. Nightingale M.A. Krattiger A.F. Holt L.M. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit compositions and the bread –making quality in British-grown wheat varieties. *Journal of Food Sciens and Agriculture*, 40:51-65.
- Payne P.I. Holt L.M. Krattiger A.F. and Carrillo J.M. 1988. Relationship between HMW glutenin subunit composition and measures of the bread-making quality of wheat varieties grown in Spain. *J. Cereal. Sci.* 7: 229-236
- Ponzio N.R. Puppo M.C., Ferrero C. 2008. Mixtures of Two Argentinean Wheat Cultivars of Different Quality: A Study on Breadmaking Performance. *Cereal Chem.* 85: 579-585.
- Prasada Rao U.J.S.; Prasad K.V.S. Nigam S.N. 2002. Physico-chemical properties of low molecular weight gliadin and its structural similarity with other wheat proteins. *J. Food Sci. Technol.* 39, 623-628
- Primo-Martin C. van Nieuwenhuijzena, N.H. 2007. Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: Starch crystallinity in the bread crust. *Journal of Cereal Science* 45 (2): 219 -226
- Programa Nacional de calidad del trigo. Origen del trigo. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación.
(www.minagri.gob.ar/new/00/programas/dma/publicaciones/calidad_de_trigo/origen.php)
- Puppo M.C. Calvelo A. Añón M.C. 2005, Physicochemical and rheological characterization of wheat flour dough. *Cereal Chem.*, 82, 173-181.
- Pyler E.J. 1988 Baking science and technology. Sosland Publishing: Merriam, KS

- Remondetto G. Añón M. C. González R. J. 2001. Hydration Properties of Soybean Protein Isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44: 425-431.
- [Ribotta](#) P.D. [Le Bail](#) A. 2007. Effect of additives on the thermo-mechanical behavior of dough systems at sub-freezing temperatures. [European Food Research and Technology](#) 4:224.
- Ribotta P.D. Ausar S.F. Beltramo D.M and Leon A.E. 2005. Interactions of hydrocolloids and sonicated-gluten proteins. *Food Hydrocoll* 19: 93-99.
- Ribotta P.D. León A.E. Pérez G.T. Añón. M.C. 2005. Electrophoresis studies for determining wheat-soy protein interactions in dough and bread. *European Food research Technology* .221:48-53
- Rodge A.B. Sonkable S.M. Salve R.V. Syed Imran Hashmi. 2012. Effect of hydrocolloid (guar gum) incorporation on the quality characteristics of bread. *Journal of Food Processing & Technology*. 3:136
- Rojas J.A. Rosell, C.M. Benedito de Barber C. 1999. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids* 13 27-33
- Roos Yrjo H. 1995. Phase Transitions in foods Academic Press San Diego. *Food Science and Technology*.
- Rosell C.M. Rojas J.A. Benedito de Barber C. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocoll*. 15: 75-81.
- Rosell M.C. Foegeding A. 2007. Interaction of hydroxypropylmethylcellulose with gluten proteins: small deformation properties. *Food Hydrocoll*. 21, 1092-1100.
- Rouau X. El-Hayek M-L. Moreau D. 1994. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread making quality of flours in relation to changes in pentosans properties. *Journal Cereals Science* 19:259-272

- Royal Society of Chemistry. Learn Chemistry: Introduction to RMN Spectroscopy. http://www.rsc.org/learn-chemistry/wiki/Introduction_to_NMR_spectroscopy (ingresado febrero 2014)
- Ruan R.R. Zou C. Wadhawan C. Martinez B. Chen P.L. Addis P. 1997. Studies of hardness and water mobility of cooked wild rice using nuclear magnetic resonance. *J Food Process. Preserv.* 21, 91-104.
- Sapirstein H.D. 1999. The imaging and measurement of bubbles in bread. Pag 233-243. in Bubbles in foods. Proc. Int. Conf. G. M. Campbell, C Webb S.S Pandiella y K Niranjana, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN
- Schieberle P. [Grosch](#) W. Identification of the volatile flavour compounds of wheat bread crust — comparison with rye bread crust. 1985. En European Food Research and Technology. Vol180 N° 2 pag 474-478
- Shalini K. G. and Laxmi A. 2007. Influence of additives on rheological characteristics of whole-wheat dough and quality chapatti (Indian unleavened flat bread) part I-hydrocolloids. *Food Hydrocolloids.* 21:110-117.
- Shannon J.C y Garwood D.L. 1984. Genetics and physiology of starch development en *Starch chemistry and technology.* pag 25-85.
- Sheffield Hallam University. NMR Spectroscopy Theoretical principles. <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/nmr1.htm> (acceso: febrero 2014).
- Shewry P.R and Tatham A.S. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.*, 25: 207-227.
- Shewry, P.R. Wheat gluten proteins. In: *Wheat gluten Protein Analysis* Eds. P.R. Shewry and G.L. Lookhart. AACC: St. Paul, MN, 2003, pp. 1-17.

- Shewry P.R. Gilbert S.M. Savage A.W.J. Tatham A.S. and Wan Y.F. 2003. Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (*Triticum durum*) which is associated with poor end use properties. *Theor. Applied Genet.*, 106: 744-750.
- Shewry P.R. Halford N.G. Belton, P. and Tatham A.S. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *The Royal Society*. 2002. 357, 133-142
- Shewry P.R Popineau Y. Lafiandra D. Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 433-441.
- Singh N.K. Shepherd K.W. Cornish G.B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenins. *J. Cereal Sci.* 14, 203-208.
- Simmonds D.H. O'Brien P. 1981. T.P. Morphological and biochemical development of the wheat endosperm. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 4 5–70.
- Slade L. Levine H. 1994. Structure-function relationships of cookie and cracker ingredients. Pages 23-141 in: *The Science of Cookie and Cracker Production*. H. Harid, ed. Chapman and Hall/AVI: New York.
- Slade L. Levine H. Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assesment of food quality and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , 1991, 30, 115-360.
- Sluimer P. 2005. *Principles of Breadmaking*, AACC, St. Paul, MN
- Sorgentini D.A. Wagner J.R. Arrese E.L. Añón, M.C. 1991. Water Imbibing capacity of soy protein isolates: influence of proteins denaturation. *J. Agric. Food Chem.* 39. 1386-1391

- Stauffer C. 1998. Principles of dough formation. Pages 262-292 in: Technology of Breadmaking. C. E. Stauffer and L. S. Young, eds. Aspen Publishers Inc.: Gaithersburg.
- Stauffer C. 1990. Functional Additives for bakery foods. Pages 157-18
- Steffolani M.E. Efecto de las enzimas pentosanases, glucosa oxidasa y transglutaminasa en productos de panificación. 2010. Tesis Doctoral UNLP, Facultad de Ciencias Exactas.
- Sugeta H. Go A. Miyazawa T. 1972. S-S and C-S stretching vibrations and molecular conformation of dialkyl disulfides and cystine, Chem Lett, 83-86,
- Talukdar M.M. Michoel A. Rombaut P. Kinget R. 1996. Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery I. Compaction and in vitro drug release behaviour. Int. J. Pharmac. 129: 233-241.
- Tu A.T. 1982 *Raman Spectroscopy in Biology. Principle and Applications*; John Wiley and Sons Eds. Inc.: New York, NY.
- Schorsch C. Garnier C. Doublier J.L. 1997. Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. Carbohydrate Polymers 34 165-175
- Van Oort M. Van Straaten F. Laane C. 1995. Pentosan and pentosanases in bread-making. International Food Ingredients, 2:23-27
- Weegels P.L. Hamer R.J. Schofield J. D. 1996. Functional Properties of Wheat Glutenin. J. Cereal Sci. 23: 1-18.
- Werle K. Grau H. Arendt E.K. 1997. Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. Cereal Chem. 74: 739-744.

- Whistler R.L. BeMiller J.N. Paschal E. F. Starch Chemistry and Technology: Segunda edición. Academic press. 1984. Orlando Florida.
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten protein. Food Microbiology. 24. 116-119.
- Wiggins C. Fermentación, horneado y enfriamiento en Fabricación de pan; 1998. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. Pag. 139-171
- Wieser H. Bushuk W. Mac Ritchie F. 2006. The polymeric glutenins (pp 213-240). En Gliadin and Glutenin: The unique balance of wheat quality editado por Wringley, C., Bekes, F., Bushuk, W. St. Paul American Association of Cereal Chemistry.
- Wong H-W. Phillips D.L. Ma C-Y. 2007. Raman spectroscopy study of amidated food proteins. *Food Chem.*, 105, 784-792.
- Yu N.T. Jo B.H. 1973. Comparison of protein structure in crystals and in solution by laser scattering, II, Ribonuclease A and Carboxypeptidase A, J, Am, Chem Soc, 95 5033-5037,
- Zgha M.C. Scanlon M.G. Sapirstein. H.D. Effects of flour strength, baking absorption, and processing conditions on the structure and mechanical properties of bread crumb. 2001. Cereal Chemistry 78(1) pag 1-7
- Zobel H.F. 1984. Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes (285-309). Capítulo IX en Starch Chemistry and Technology (Segunda edición). Editado por Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Paschall, E. Academic Press Inc. Florida, Estados Unidos



Glosario

Abreviaturas utilizadas

A	Absorción farinografica
AACC	Approved Methods of the American Association of Cereal chemists
A.C	Antes de Cristo
ADH	Adhesividad
Afl.	Aflojamiento
AL	Almidón
ANMAT	Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología medica
Art.	Articulo
AP	amilopectina
AS	amilosa
CAA	Código Alimentario Argentino
Cap.	capitulo
COH	Cohesividad
CP1	Componente principal 1
CP2	Componente principal 2
cps	centipoise
Da	dalton
DATEM	Esteres de acido diacetil tartarico de mono y digliceridos
DE	Desviación estándar
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
DUR	Dureza
EC	Ecuación
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
ELA	Elasticidad
EST	Estabilidad
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación perteneciente a las Naciones Unidas
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
FT-Raman	Espectroscopía Raman por transformada de Fourier
g	Gramo

GG	Goma guar
GX	Goma xántica
H	Humedad
HG	Hebra de gluten
HMW-GS	Subunidades de gluteninas de alto peso molecular
HPMC	Hidroxipropil metil celulosa
Kg	kilogramo
L	extensibilidad
LBG	Goma garrofín
LG	Lamina de gluten
LI	Lipido
LMW-GS	Subunidades de gluteninas de bajo peso molecular
ml	mililitro
mm	milimetro
P	tenacidad
PCA	Análisis de componentes principales
PE	Pectina
RMN	Resonancia magnética nuclear
IS-SDS	Índice de sedimentación con dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopia diferencial de barrido
-SH	sulfhidrilos
SRC	Capacidad de retención de solvente
-S-S-	Puentes disulfuro
SSL	Movilidad molecular
T ₂	Estearoil-2-lactil-lactato
t _d	Tiempo de desarrollo farinografico
t _e	Tiempo de estabilidad farinografica
Tf	Temperatura final
Ti	Temperatura inicial
TPA	Análisis de perfil de textura
TPI	Temperatura de pico I
TPII	Temperatura de pico II
UB	Unidades Brabender

USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
W	Trabajo de deformación alveografica
WIC	Capacidad de absorción de agua